

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE BANANEIRA
CULTIVAR TERRA TRANSFORMADA COM O GENE *stx*.**

MANUELA ROCHA DE BRITO

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
SETEMBRO - 2010**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE BANANEIRA
CULTIVAR TERRA TRANSFORMADA COM O GENE *stx*.**

MANUELA ROCHA DE BRITO

Bióloga

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2007

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Miguel Angel Dita Rodríguez

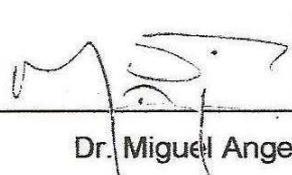
Co-Orientador: Edson Perito Amorim

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

SETEMBRO – 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MANUELA ROCHA DE BRITO



Dr. Miguel Ange Dita Rodriguez
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical
(Orientador)



Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa
Universidade Estadual de Santa Cruz



Dra. Claudia Ferreira Fortes
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
SETEMBRO – 2010

Ao meu pai **Valmir Brito** (in memoriam). A dor da perda é muito grande, mas nunca, em momento algum, será maior que a felicidade e privilégio que tive em ser sua filha. Verdadeiramente o meu maior mestre!

OFEREÇO

A minha querida mãe **Irení** por suas sábias lições de esperança, sempre com palavras positivas como: amor, crença, compreensão e alegrias. Obrigada por dar-me todo apoio quando preciso. Meu amor é incondicional. Ao meu irmão **Ícaro** que tanto amo e que faz meus dias mais felizes!

Ao meu namorado **Rafael**, por acreditar em mim e proporcionar-me tantos momentos felizes, mesmo com os vários quilômetros de distância que hoje nos separam. Estou certa que todo esse sacrifício vai ser recompensado com um futuro maravilhoso que teremos juntos!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento de agradecer a todos meus familiares e amigos – tantos aos “velhos” amigos quanto aos que se revelaram ao longo desse tempo.

Antes de mais nada, agradeço a Deus por permitir ter chegado até aqui mesmo diante tantos momentos difíceis desta caminhada;

Aos meus queridos familiares, pessoas mais que especiais em minha vida, agradeço por todo amor e dedicação;

Ao meu orientador Dr. Miguel Angel Dita, que devoto a mais sincera e profunda admiração. Serei eternamente grata por todo apoio dado na orientação dessa dissertação. Foram dois anos de confiança, oportunidade de crescimento profissional e muitos ensinamentos;

Ao co-orientador Dr. Edson Perito pela colaboração durante a execução deste trabalho, sempre procurando reunir o “Grupo Banana” para enriquecimento do tema;

Ao pesquisador Dr. Carlos Ledo pela grande ajuda na realização das análises estatísticas;

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Jorge Teodoro, pela imensa capacidade de gerir essa equipe;

Aos professores que compõem o Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da UFRB, pelos ensinamentos transmitidos com seriedade e compromisso;

A todos os funcionários da Secretaria do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. Agradeço também a todos os colegas da turma 2008.2 do Mestrado em Microbiologia Agrícola.

Aos grandes amigos que se revelaram ao longo desses dois anos de mestrado e que fizeram parte dessa caminhada a cada instante, nos momentos de dores e alegrias: Paty, Aline, Vini, Adailson, Adri, Augusto, Tâmara, Ricardo, Dayse e Juan. Sempre levarei vocês em meu coração!

AGRADECIMENTOS (Cont.)

Meu grande agradecimento a toda equipe que compõe o Laboratório de Fitopatologia e o Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pelo ótimo convívio e constante auxílio na realização desse trabalho;

A Daniela e Carine, que ajudaram diretamente na execução desse trabalho.

A todos os funcionários da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, especialmente a Bizunga por ser uma pessoa maravilhosa e que durante todo esse tempo ajudou a cuidar das minhas queridas plantas em casa-de-vegetação e por todos ensinamentos referente à cultura da bananeira;

Ao Dr. Marcio Costa pela oportunidade de realizar parte do meu trabalho na Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC;

Ao pessoal do laboratório de Cultura de Tecidos e Biologia Molecular da UESC, em especial a Luciana Cidade, que além de me auxiliar na realização do Southern blot, se tornou uma grande amiga. A Diana Matos pela amizade sincera e pela acolhida em sua casa durante a execução desta etapa do trabalho;

Aos meus queridos amigos, que mesmo me longe sei que torcem por mim: Carol, Charlene, Jessé, Juliana, Maria, Patrícia e Thiago;

A Embrapa Tabuleiros Costeiros, pela imensa colaboração na inoculação do patógeno nas plantas de bananeira. Agradecer em especial ao Dr. Leandro Diniz;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo.

Há muito mais a quem agradecer..., a todos aqueles que também fizeram parte dessa jornada, embora não nomeados, muitíssimo obrigada!

“Se o desafio era enorme, as motivações eram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de angústia e sofrimento em uma estrada larga, margeada de flores, frutos e frondosas árvores! ”

(Maria Tavares)

A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.

(Eduardo Galeno)

ÍNDICE

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01
 CAPÍTULO 1	
O Moko da bananeira: aspectos gerais da doença e uso de peptídeos antibacterianos na engenharia genética.....	03
1.1 A cultura da banana.....	06
1.2 Panorama da bananicultura mundial.....	10
1.3 Características de <i>Ralstonia solanacearum</i>	13
1.4 <i>Ralstonia solanacearum</i> em culturas agronômicas e florestais.....	17
1.5 O Moko da bananeira.....	18
1.6 Processo de infecção e mecanismos de patogenicidade de <i>Ralstonia solanacearum</i>	20
1.7 Sintomas do Moko da bananeira.....	21
1.8 Controle do Moko da bananeira.....	23
1.9 Peptídeos antimicrobianos e sua aplicação na obtenção de plantas transgênicas.....	24
 CAPÍTULO 2	
Caracterização molecular e fenotípica da bananeira cultivar Terra transformada com o gene <i>stx</i>	28
2.1 Introdução.....	31
2.2 Material e Métodos.....	33
2.3 Resultados.....	42
2.4 Discussão.....	49
 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 54
REFERÊNCIAS.....	56

RESUMO

Brito, M. R. Caracterização molecular e fenotípica da bananeira cultivar Terra transformada com o gene *stx*.

Muitas doenças afetam significativamente a bananicultura, a exemplo do Moko, causada pela raça 2 de *Ralstonia solanacearum*. O uso de variedades resistentes é o método de controle mais adequado desta doença, porém a maioria das variedades é altamente suscetível e não se conhecem fontes de resistência natural. Visando contornar esse problema, pesquisas realizadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical geraram diferentes eventos de transformação da cultivar Terra Maranhão (AAB) transformadas com o gene *stx*, que codifica para a sarcotoxina IA. O presente trabalho objetivou caracterizar esses transformantes fazendo análises comparativas com plantas não transformadas. Foram realizados estudos visando: a) confirmar a inserção e número de cópias do gene *stx*, b) caracterizar morfológicamente os transformantes, c) verificar o efeito da inserção do gene *stx* sobre a população de microrganismos, e d) caracterizar os transformantes quanto à resistência ao Moko da bananeira. As análises de Southern blot permitiram confirmar a inserção do transgene. Apenas o evento 27::1 mostrou um perfil diferente quanto ao número de cópias. Embora as análises morfológicas revelassem a presença de três grupos diferentes, esta variabilidade não foi associada à transgenia. Não foi detectada qualquer diferença entre plantas transformadas e não transformadas quanto à população de fungos avaliados. Todavia, houve uma redução significativa da população de bactérias endofíticas nas raízes de plantas transformadas sugerindo um potencial efeito da sarcotoxina IA sobre esses microrganismos. Foram verificadas diferenças quanto à reação de resistência a *R. solanacearum* em termos de redução de taxa de progresso da doença e valores finais de severidade. Todavia, não foi possível observar um efeito significativo na redução dos sintomas de Moko. Os resultados obtidos, apesar de parciais, abrem novas perspectivas sobre o potencial e riscos de uso deste tipo de genes na agricultura.

Palavras - chaves: Moko da bananeira, *Musa* spp., *Ralstonia solanacearum*.

ABSTRACT

Brito, M. R. Phenotypic and molecular characterization of banana cultivar Terra transformed with the *stx* gene.

Banana and plantain production is affected by several diseases, such as Moko, caused by *Ralstonia solanacearum* race 2. Use of resistant varieties is the most desirable control method, but most available banana genotypes are highly susceptible and no resistant sources are known. In this sense, researchers at Embrapa Cassava and Tropical Fruits started studies aiming to obtain resistant plants by using genetic engineering approaches. These studies generated several transgenic lines of the banana cultivar Terra Maranhão (AAB) carrying the *stx* gene, which encodes to sarcotoxin IA. This work aimed to characterize at phenotypic and molecular levels these transgenic lines by means of comparative analysis with its relative wild type. Studies addressed to a) confirm the insertion copy number of *stx* gene, b) characterize morphologically the plants, c) verify the effect of *stx* expression against endophytic and rhizosphere associated microorganism and d) evaluate the resistance to banana Moko disease, were performed. Southern blot analyses confirmed the *stx* gene insertion. Only the 27::1 line showed a different profile regarding the transgene copy numbers. Despite that the morphological analyzes ranked the genotypes in three different groups, it was not considered as changes induced by the transgene insertion, but as a normal variability of the used parameters. Differences between transformed and wild type plants regarding reduction of fungal populations were no observed. However, there was a significant reduction of the endophytic bacterial population in the roots of transformed plants, suggesting a putative effect of *stx* expression against the endophytic bacterial population. Despite the differences in terms of Moko disease progress rate and severity verified, it no significant effect of *stx* on Moko intensity reduction was several. Although these results obtained are preliminary, its opens up new prospects of potential and risks of using antimicrobial wide-spectrum genes to produce diseased resistente cultivars for agricultural purposes.

Keywords: Banana Moko disease, *Musa* spp., *Ralstonia solanacearum*.

INTRODUÇÃO

Originária do Sudoeste da Ásia e símbolo dos países tropicais, a banana (*Musa ssp.*) é a fruta fresca mais consumida no mundo. Esta fruteira é considerada mundialmente um importante alimento em razão da sua composição química e conteúdo em vitaminas e minerais, bem como pela sua versatilidade e de modalidades de uso (processamento, frita, cozida, consumo *in natura*) (LIMA, et al., 2003).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a bananicultura está entre as atividades agrícolas de maior expressão econômica e elevado alcance social no Brasil. Os principais Estados produtores são: Bahia, São Paulo e Santa Catarina (IBGE, 2010). Todavia, a produção de banana apresenta problemas fitossanitários que afetam significativamente a sustentabilidade desta atividade e podem constituir sérias ameaças para a cultura, a exemplo do mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) a Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) e a murcha bacteriana ou Moko da bananeira, causada pela raça 2 da bactéria *Ralstonia solanacearum* *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (HAYWARD, 1994; YABUUCHI et al., 1995).

A confirmação oficial do Moko no Brasil ocorreu em 1976, no Território Federal do Amapá e, atualmente, está presente em quase todos os estados da região Norte e Sergipe. A doença é um sério entrave para a produção de banana na região Amazônica e representa uma ameaça para outras regiões do Brasil. A bactéria provoca infecção sistêmica e pode atingir todos os órgãos da planta, independentemente do estágio fenológico, desde o estágio de brotação jovem até plantas em produção (KIMATI et al. 2005).

O Moko é praga quarentenária A2 (praga quarentenária presente, mas não se encontram amplamente distribuídas) e por esta razão, devem ser tomadas medidas baseadas no princípio de exclusão. Assim, o controle deve ser focado na prevenção da entrada da doença em áreas consideradas livres da praga. Após a constatação da doença, a medida a se tomar é a erradicação imediata dos focos, visando impedir o estabelecimento da doença e sua disseminação (MICHEREFF e BARROS, 2001).

O uso de cultivares resistentes seria a medida de controle mais adequada. Todavia até o momento, não foram constatadas fontes de resistência natural, o

que limita a obtenção de genótipos resistentes via melhoramento convencional (SILVA et al. 2004).

Nesse sentido, o Programa Nacional de Melhoramento Genético de Bananeira, conduzido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical iniciou os trabalhos de transformação genética de bananeira com o gene *stx* que codifica para a sarcotoxina IA, procedente da *Sarcophaga peregrina* (mosca varejeira). A sarcotoxina IA é um peptídeo antimicrobiano com comprovada ação antibacteriana (ALY et al., 1999; OHSHIMA et al., 1999; MITSUHARA et al., 2000). Nesse intuito, eventos de transformação de bananeira cultivar Terra Maranhão foram obtidos.

O presente trabalho objetivou caracterizar em nível molecular e fenotípico esses transformantes fazendo análises comparativas com plantas não transformadas. Foram realizados estudos visando: a) confirmar a inserção e número de cópias do gene *stx*, b) caracterizar morfológicamente os transformantes, c) verificar o efeito da expressão do gene *stx* sobre a população de microrganismos endofíticos e ou associados à rizosfera, e d) caracterizar os transformantes quanto à resistência ao Moko da bananeira. A dissertação está dividida em dois capítulos. O primeiro é uma revisão bibliográfica onde se abordam aspectos relevantes sobre a cultura da banana e do Moko da bananeira. Adicionalmente, aspectos relacionados à transgenia e peptídeos antimicrobianos foram discutidos, relatando estudos já realizados utilizando estes peptídeos visando aumentar a resistência de plantas a doenças bacterianas. No segundo capítulo resultados das pesquisas conduzidas neste trabalho são apresentados.

CAPÍTULO 1

Moko da bananeira: aspectos gerais da doença e uso de peptídeos antibacterianos na engenharia genética

RESUMO

Brito, M. R. O Moko da bananeira: aspectos gerais da doença e uso de peptídeos antibacterianos na engenharia genética

Foi realizada uma revisão sobre as particularidades da cultura da banana e seus problemas fitossanitários com foco no Moko da bananeira. Foram também discutidos aspectos sobre o uso de peptídeos antimicrobianos na obtenção de plantas geneticamente modificadas. Inicialmente foi descrita a origem, distribuição geográfica, classificação botânica e aspectos morfológicos inerentes a cultura da bananeira, sempre com ênfase na cultivar Terra Maranhão (AAB). Além disso, uma abordagem panorâmica foi abordada, ressaltando a posição do Brasil no *ranking* dos maiores produtores mundiais. Por constituir o principal fator limitante ao desenvolvimento da bananicultura, aspectos referentes ao Moko da bananeira, como características da *Ralstonia solanacearum* envolvendo toda uma complexidade de classificação, a etiologia da doença, a epidemiologia e controle foram cuidadosamente discutidos. Finalmente, uma abordagem sobre o uso de peptídeos antimicrobianos e sua aplicação na obtenção de plantas transgênicas visando resistência a fitopatógenos foi relatada, ressaltando a necessidade de realização de trabalhos nessa direção.

Palavras-chaves: Cultivar Terra Maranhão, *Ralstonia solanacearum*, Transgênicas.

ABSTRACT

Brito, M. R. Banana Moko disease: general aspects of the disease and use of antibacterial peptides in genetic engineering

A review was made on the particularities of the banana plant and its problems with focus on Moko of banana. Some aspects about the use of antimicrobial peptides to obtain genetically modified plants were discussed. Initially the origin, geographical distribution, botanical classification and morphological features inherent culture of banana were described, with an emphasis on cultivating the Terra Maranhão (AAB). In addition, an overview approach was discussed, highlighting Brazil's position in the ranking of the largest producers. Considering the main limiting factor to banana cultivation, the aspects related to the Moko of banana, as the *Ralstonia solanacearum* classification, disease etiology, epidemiology and control were thoroughly discussed. Finally, a discussion on antimicrobial peptides and their application to produce transgenic plants aiming resistance to plant pathogens were reported, emphasizing the researches needed in that direction.

Keywords: Cultivar Terra Maranhão, *Ralstonia solanacearum*, Transgenic.

1.1 A cultura da banana

A palavra banana tem origem africana e é conhecida também pelos nomes de banano, plátano, guineo e camburé (SOTO BALLESTERO,1992). Segundo Alves (2001) a banana é considerada uma das primeiras frutas utilizadas na alimentação humana e é originária do Sudoeste da Ásia, nas regiões que hoje compreendem Filipinas, Malásia e Indonésia. Posteriormente se disseminou para outras regiões da Ásia, Índia e África. Somente no século XVI (1516) foi que os europeus a introduziram na América, onde encontrou condições climáticas favoráveis para seu desenvolvimento. No Brasil, o cultivo se espalhou rapidamente entre as comunidades indígenas e em pouco tempo passou a ser parte integrante de um número significativo de pratos tradicionais.

Atualmente, é um cultivo de ampla distribuição pela sua adaptação tanto nos trópicos como nos subtropicais (ALVES, 2001; SOTO-BALLESTERO, 1992).

A distribuição geográfica da bananeira é normalmente encontrada na faixa compreendida entre 30° latitude norte e 30° de latitude sul. Segundo Moreira (1999), existe ainda a possibilidade de seu cultivo em latitudes acima de 30°, entretanto, nem todas as regiões dentro dessa faixa apresentam condições favoráveis ao plantio comercial por apresentar características como altas temperaturas constantes, umidade relativa elevada ou inadequada distribuição das chuvas (DANTAS e SOARES FILHO 2000).

Monocotiledônea e herbácea perene, a bananeira possui um ciclo vegetativo com desenvolvimento de forma contínua e acelerada. É uma planta muito exigente em relação à temperatura e à umidade, sendo recomendado índice pluviométrico mensal de 100 mm e temperatura em torno de 28 °C. A oscilação desses índices pode implicar na redução no desenvolvimento da planta (MOREIRA, 1987). O período compreendido entre o plantio e a colheita do fruto pode oscilar de 12 a 18 meses (LIMA, 2003). É propagada vegetativamente por meio de mudas ou brotos, embora espécies selvagens sejam propagadas por sementes (ALVES, 2001).

A bananeira pertence à divisão Angiospermae, classe Monocotyledoneae, ordem Scitaminae e família Musaceae (DANTAS e SOARES FILHO, 2000). A família Musaceae é constituída por dois gêneros: *Musa* (bananas comestíveis) e

Ensete (bananas silvestres). O primeiro apresenta 35 espécies e o segundo sete espécies (ROCHELLE et al., 1991).

A classificação proposta por Cheesman em 1948 e aceita atualmente no mundo inteiro para o gênero *Musa*, baseia-se na divisão em 4 subgêneros: *Eumusa* e *Rhodochlamys* ($2n = 22$), *Callimusa* e *Australimusa* ($2n = 20$). Os subgêneros *Callimusa* e *Rhodochlamys* isoladamente não produzem frutos comestíveis. O subgênero *Australimusa* compreende cinco espécies, das quais a *Musa textilis* e a *Musa fehi* são mais conhecidas, sendo utilizadas em alguns países para extração de fibras têxteis das bainhas vasculares. No subgênero *Eumusa*, ou simplesmente *Musa*, se encontram as bananas comestíveis que tem grande valor comercial como a *Musa acuminata* e *Musa balbisiana* (DANTAS e SOARES FILHO, 2000).

Na evolução das bananeiras comestíveis participaram, principalmente, as espécies diplóides selvagens *M. acuminata* (genoma A) e *M. balbisiana* (genoma B), do subgênero *Eumusa*, de modo que os genótipos podem conter combinações variadas de genoma completo dessas espécies. Da combinação entre estes diplóides selvagens resultaram os seguintes grupos: diplóides (AA, BB e AB), triplóides (AAA, AAB e ABB) e tetraplóides (AAAA, AAAB, AABB, ABBB) (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955) (Figura 1.1).

Além da participação das espécies *M. acuminata* e *M. balbisiana*, também houve a contribuição de outras espécies, como *M. angustigemma* (genoma T), do subgênero *Australimusa* e da *M. schizocarpa* (genoma S), do subgênero *Rhodochlamys*. O envolvimento dessas seções em algumas cultivares da Nova Guiné foi comprovada por GISH (*genomic in situ hybridization*), onde se identificaram as combinações AS, AAS, ABBS, AAT e ABBT em bananeira (D'HONT et al., 2000).

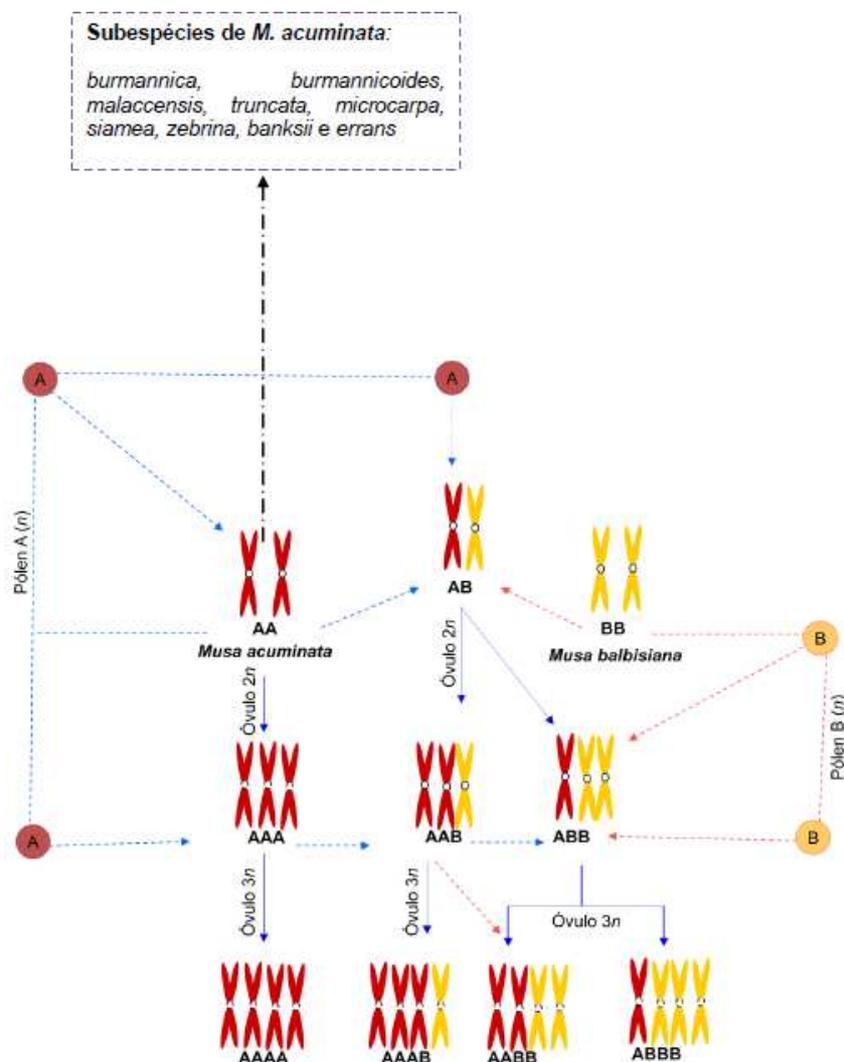


Figura 1.1: Evolução da bananeira a partir das espécies *Musa acuminata* e *Musa balbisiana* (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955).

As cultivares mais difundidas no Brasil são a Prata, Pacovan, Prata Anã, Maça, Mysore, Terra e D'Angola, do grupo AAB, utilizadas unicamente para mercado interno; Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo AAA, usadas principalmente para exportação. Em menor escala, são plantadas 'Ouro' (AA), 'Figo Cinza' e 'Figo vermelho' (ABB), 'Caru Verde' e 'Caru Roxa' (AAA). (SILVA et al., 1999).

Morfologicamente, a bananeira é um vegetal completo, cujas principais partes são: sistema radicular, caule subterrâneo (rizoma), pseudocaule, folhas e cacho (Figura 1.2).

O sistema radicular da bananeira é formado por uma raiz principal, ou primária, da qual se desenvolvem, lateralmente, as raízes secundárias e terciárias, responsáveis pela absorção de água e nutrientes. O rizoma é o local

onde ocorre a formação das raízes, das folhas, da inflorescência e a geração de novos rebentos (MANICA, 1997).

O pseudocaule corresponde o que normalmente é denominado de caule e possui uma estrutura constituída pelas bainhas foliares sobrepostas. No prolongamento das bainhas encontram-se as folhas, que, por conseguinte são compostas de bainha foliar, pecíolo, nervura central e limbo foliar. A folha da bananeira que ainda não se abriu chama-se de vela, charuto ou folha-bandeira (LIMA, 2003).

O cacho é composto pelo: engaço, ráquis e coração. O engaço é o pedúnculo da inflorescência, que tem início no ápice do pseudocaule e termina na inserção da primeira penca. O ráquis é o eixo de inflorescência, que inicia no ponto onde termina o engaço e alonga-se até o local de inserção do botão floral. As flores femininas formarão os frutos e estão inseridas no ráquis feminino, que se inicia no ponto onde começa a primeira penca e estende-se até a última. As flores masculinas estão no ráquis masculino, a partir do ponto de inserção da última penca e termina no botão floral (MANICA, 1997).

A penca é formada pelo conjunto de frutos, estruturadas em duas fileiras horizontais e paralelas. O ponto de fusão dos pedúnculos recebe o nome de “almofada”. O conjunto de flores masculinas ainda em desenvolvimento é conhecido como botão floral ou “coração” (SIMÃO, 1971).

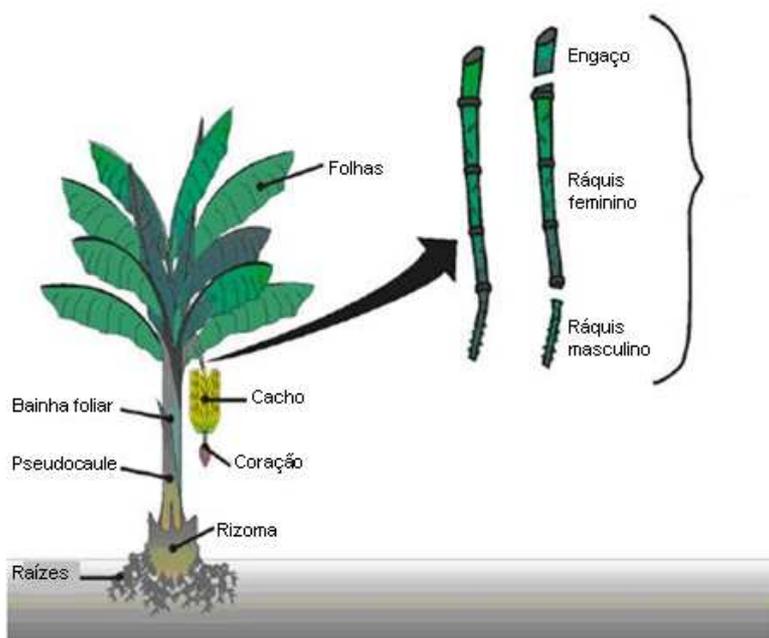


Figura 1.2: Estrutura e partes da bananeira. (SOFFNER, 2001).

Os tamanhos das partes da bananeira dependerão da espécie, cultivar, condições edafoclimáticas e tratos culturais. A cultivar Terra ou Plátanos são muito heterogêneas, possuem frutos grandes e são consumidos na maioria das vezes fritos, cozidos ou assados, devido ao seu alto conteúdo amiláceo, mesmo quando maduras. Apresentam porte alto, podendo atingir até 5,9 m de altura. São plantas muito robustas e vigorosas, com um pseudocaule forte de 20 a 25 cm de diâmetro. As folhas em número de 35 a 41 por planta são largas e compridas, de coloração verde clara, têm brácteas e restos florais persistentes e coração bem desenvolvido. Os cachos são médios a grandes, com 8 a 12 pencas por cacho, apresentando frutos compridos e grossos, pesando de 150 a 200 g e comprimento entre 23 a 29 cm (MANICA, 1997).

Durante o seu ciclo, a bananeira está sujeita a ocorrência de mais de 20 doenças, sejam essas de etiologia fúngica, viral, nemátoda ou bacteriana (CORDEIRO, 2000; PEREIRA et al., 2000; ZAMBOLIM et al., 2002).

1.2 Panorama da bananicultura mundial

A banana assume lugar de destaque na produção mundial de bens agrícolas por parte de diversos países, principalmente aqueles localizados nos trópicos. Além de ser um alimento complementar da dieta da população, a banana apresenta grande relevância social e econômica, servindo como fonte de renda para muitas famílias de agricultores. A atividade gera postos de trabalho no campo e na cidade e contribui direta e indiretamente para o desenvolvimento das regiões envolvidas em sua produção (FIORAVANÇO, 2003).

Segundo o Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola (2009), seus frutos representam a quarta mercadoria mais importante comercializada no mundo, precedido pelo arroz, trigo e milho. Alguns aspectos contribuem para que a banana continue sendo a fruta mais comercializada no mundo, como a facilidade de propagação, o bom rendimento por hectare, o fato de ser uma cultura de ciclo curto, de produção contínua, de fácil manipulação quando verde, além de fácil armazenamento e maturação acelerada (ALVES, 2001).

Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*), em 2008 a produção mundial foi de aproximadamente 90,7 milhões de toneladas e rendimento médio de 18,8 toneladas por hectare (FAO, 2008). A Índia lidera o *ranking* dos países

produtores, seguida por Filipinas, China, Brasil e Equador (Figura 1.3). Sua produção foi superada apenas pela melancia, com 93,2 milhões de toneladas; a uva vem na terceira posição, com 66,3 milhões de toneladas, seguida pela maçã, com 64,2 milhões de toneladas e laranja, com 63,9 milhões de toneladas.

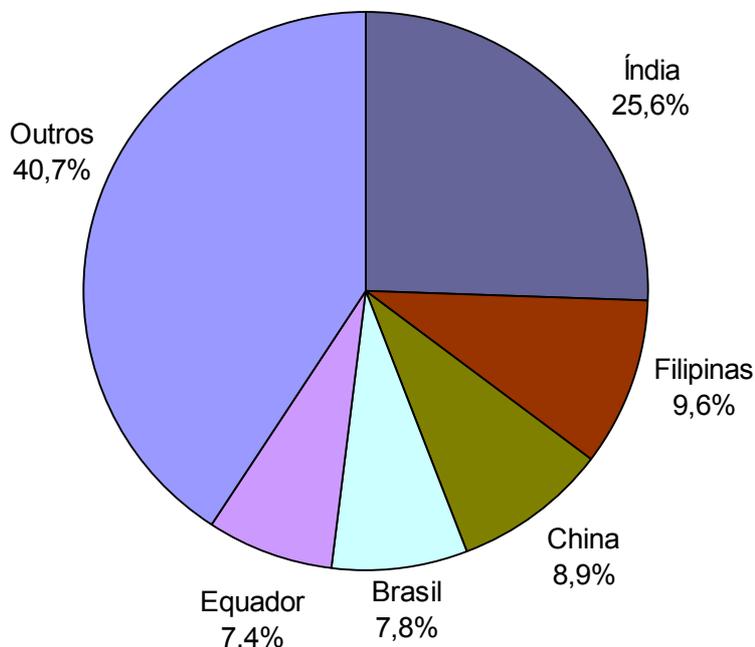


Figura 1.3: Participação dos principais países na produção mundial de banana em 2008. (FAO, 2008).

Os países da América Latina são os maiores exportadores de banana, com o domínio de 80% do mercado, sendo o Equador o maior exportador da fruta. Outros exportadores importantes são Costa Rica, Filipinas, Colômbia e Guatemala. Os Estados Unidos são os maiores importadores, com 33% do mercado de banana (FAO, 2008).

No Brasil, a banana é a segunda fruta mais produzida, atrás apenas da laranja, cuja produção está fortemente associada ao processamento industrial de suco concentrado para exportação. Segundo dados do IBGE, o cenário da bananicultura no Brasil registra um total de 7,43 milhões de toneladas produzidas, uma área plantada de 562,1 mil hectares e uma área colhida de 531,83 mil hectares (IBGE, 2010). A Bahia é o maior estado produtor, seguido de São Paulo, Santa Catarina, Pará e Minas Gerais (Figura 1.4) (FAO, 2008). As regiões produtoras de maior destaque no Brasil são o Vale do Ribeira, no Estado de São

Paulo, Jaraguá do Sul, em Santa Catarina, Janaúba no Norte de Minas e Petrolina/Juazeiro no Nordeste (BORBOREMA, 2003).

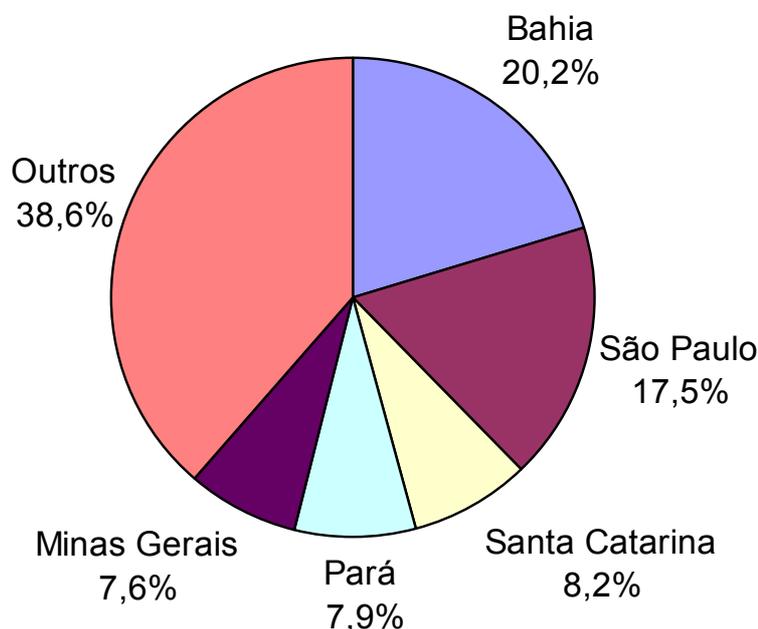


Figura 1.4: Principais Estados produtores de banana no Brasil em 2008. (FAO, 2008).

As cultivares mais plantadas no Brasil são: Prata, Pacovan, Prata Anã, Maçã, Mysore, Terra, D'Angola, Nanica, Nanicão, Grande Naine e Ouro. Neste cenário, a cultivar Terra, utilizada no presente trabalho, não apresenta grande destaque em termos de cultivo no Brasil. São cultivadas geralmente por pequenos agricultores, como fonte adicional de renda, sem utilizarem tecnologia e insumos modernos para aumentar a produtividade e melhorar a qualidade do produto para exportação (ALVES, 2001).

A FAO não registra a produção de plátanos no Brasil devido a pouca expressividade dessa cultura. Contudo, países como a Uganda, Colômbia e Gana são os principais produtores e representam respectivamente 27,3%, 9,8% e 8,5 % da produção de plátanos (FAO, 2008).

Existem poucas publicações técnico-científicas sobre banana tipo Terra no Brasil, e seu cultivo se baseia em tecnologias exploradas de outras cultivares (MOURA et al., 2002).

Dentre as moléstias que afetam significativamente tanto a bananeira quanto outras culturas agrônômicas, a murcha bacteriana que possui como agente etiológico a *Ralstonia solanacearum*, é considerada a principal doença vascular de origem bacteriana no mundo (HAYWARD, 1991).

1.3 Características de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum é uma bactéria gram-negativa, habitante do solo, aeróbica, bastonetiforme, com dimensões de 0,5 a 1,0 μm x 1,5 a 3,0 μm , com células não esporogênicas, que apresenta um ou mais flagelos polares, raramente imóveis (PELCZAR et al., 1996; GENIN e BOUCHER, 2002). Como fonte energética *R. solanacearum* acumula poli-B-hidroxibutirato e faz parte do grupo das bactérias não fluorescentes. Embora não produza pigmento fluorescente, produz pigmento marrom em meio de cultura sólido contendo tirosina. Frequentemente pode reduzir nitrato a nitrito com produção de gás, mas não hidrolisa o amido. É fraca degradadora de gelatina e não utiliza arginina ou betaina como fonte de carbono. É tolerante a sais e a temperatura mínima de crescimento está entre 8 – 10°C, ótimo de 32 – 35°C e temperatura máxima de aproximadamente 40°C. A tolerância mínima de pH é 6,0, ótimo de 6,6 e máximo de 8,0 (MEHAN et al., 1994; ALIPPI et al., 2003).

A bactéria possui um genoma composto de dois replicons circulares constituídos de um cromossomo de 3,7 megabases (Mb) e um megaplasmídio de 2,1 Mb, característica conservada em grande partes das estirpes analisadas (SALANOUBAT, et al., 2002). As duas moléculas têm o conteúdo de C + G parecido, 67,04% e 66,86% para o cromossomo e para o megaplasmídio, respectivamente, e um genoma que codifica 5.129 proteínas. Pequenos plasmídeos de menos de 100 quilobases (Kb) podem ser encontrados em algumas variantes e provavelmente estão relacionados à transferência lateral de genes de outras bactérias do solo (GENIN e BOUCHER, 2002).

Com relação à classificação intra-específica, *R. solanacearum* é classificada em cinco raças com base na espécie hospedeira (Tabela 1.1). Estirpes da raça 1 afetam um maior número de culturas, incluindo batata (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Solanum lycopersici* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e solanáceas em geral. A raça 2 é patogênica a musáceas

(bananeira triplóide e *Heliconia* sp.), enquanto a raça 3 é considerada específica da batata e ocasionalmente tomate (BUDDENHAGEN et al., 1962 HAYWARD, 1994; SILVEIRA et al., 2002). Outros autores ainda propuseram a adição de mais duas raças a este sistema de classificação. A raça 4 é característica de estirpes que afetam o gengibre e a raça 5, relatada na China, infecta plantas de amora (HE et al., 1983).

Tabela 1.1: Classificação intra-específica de *Ralstonia solanacearum*

Raças	Biovar	Hospedeiro
1	I, II, IV	Diversos
2	I, III, VI	Musáceas
3	II, IIA, IIT	Batata e gerânio
4	III e IV	Gengibre
5	V	Amoreira

Fonte: Daughtrey (2003)

Além da classificação em raças, *R. solanacearum* pode ser distinguida em biovares de acordo com a capacidade de metabolizar açúcares e alcoóis. Hayward (1964) considerou a existência de quatro biovares e, posteriormente, He et al. (1983) propuseram uma nova biovar (V), conforme Tabela 1.2.

Tabela 1. 2. Determinação de biovares de *Ralstonia solanacearum*

Testes	<i>Ralstonia solanacearum</i>				
	Biovar I	Biovar II	Biovar III	Biovar IV	Biovar V
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-
Trealose	+	-	+	+	+
Lactose	-	+	+	-	+
Maltose	-	+	+	-	+
Celobiose	-	+	+	-	+
Gás em nitrato	-	-	+	+	+

Fonte: Schaad et al. (2001)

As estirpes dos biovares I e II encontram-se amplamente distribuídas. O biovar I é encontrado geralmente em regiões de clima quente e caracteriza-se por afetar o maior número de espécies de plantas. A biovar II corresponde à raça 3 e predomina em regiões de clima temperado, sendo composta por estirpes que infectam predominantemente culturas de batata. A biovar III está adaptada as regiões quentes dos trópicos (HAYWARD, 1991). Estirpes pertencentes à biovar IV normalmente infectam gengibre e a biovar V, encontrada na China infecta plantas de amoreira (HE et al., 1983).

A aparente homogeneidade das biovares pode ser diminuída com a adição de outros critérios fenotípicos como foi comprovado com diferentes isolados da biovar II, que era considerado previamente como um grupo homogêneo quanto à característica fenotípica (HAYWARD, 1994). Esta nova subdivisão da biovar II se realiza com provas adicionais usando os açúcares trealose, inositol e D-ribose, bem como na determinação de atividade pectolítica e de redução de nitrato. Com base nesses critérios adicionais, novos fenótipos foram obtidos de isolados da biovar II, que foram designados como biovar IIA (A de andino) e IIT (T de tropical), conforme Tabela 1.3 (HAYWARD, 1994).

Tabela 1.3. Diferenciação da biovar II

Testes	Biovar II	Biovar IIA	Biovar IIN ou T
Utilização de trealose	-	+	+
Utilização de inositol	+	-	+
Utilização de D-ribose	-	-	+
Atividade pectinolítica	baixa	Alta	Alta

Fonte: Janse (2005)

Fegan e Prior (2005), fundamentados em estudos moleculares, apoiaram a ideia de que *R. solanacearum* é um grupo de espécies e não uma espécie única, e propuseram um novo sistema de classificação genética baseada em quatro níveis taxonômicos equivalentes a espécies, subespécies, grupos intra-subespecíficos e linhagens clonais (Tabela 1.4).

Tabela 1.4. Esquema de classificação de *Ralstonia solanacearum*

Nível taxonômico	Equivalência taxonômica	Nomenclatura	Método de identificação
Espécie	Espécie	<i>R. solanacearum</i>	PCR
Filotipo	Subespécie	Filotipos I, II, III e IV	PCR multiplex (região ITS)
Sequevar	Grupos intra-subespecíficos	Sequevares 1-23	Sequenciamento e análises do gene <i>egl</i> (endoglucanase)
Clone	Linhagens clonais		<i>Fingerprinting</i> do genoma (rep-PCR, RAPD, AFLP, PFGE (pulsotipo), etc)

Fonte: Fegan e Prior (2005).

Baseados na análise de sequências de rDNA 16S, dos genes *mutS*, *hrpB* e *egl* e regiões ITS, Fegan e Prior (2005) propuseram uma divisão de *R. solanacearum* em quatro filotipos. Cada filotipo reflete a origem geográfica da estirpe, onde os filotipos I e II apresentam estirpes da Ásia e América, respectivamente, o filotipo III estirpes da África, e o filotipo IV agrupa isolados da Indonésia, Japão e Austrália. Posteriormente, os filotipos foram subdivididos em 23 sequevares, baseado em sequenciamento do gene *egl* (endoglucanase) e análises filogenéticas deste (FEGAN e PRIOR, 2005; PRIOR e FEGAN, 2005).

Estudos relacionados à diversidade genética de linhagens de *R. solanacearum* capazes de causar murcha bacteriana em banana revelaram a predominância do filotipo II, independente da região de origem (FEGAN e PRIOR, 2006; PINHEIRO, dados não publicados)

Fegan e Prior (2005) também classificaram *R. solanacearum* em linhagens clonais baseados em métodos *fingerprinting* do genoma através de rep-PCR, RAPD, AFLP e PFGE. Recentemente os autores Stevens e Van Elsas (2010) classificaram *R. solanacearum* por pulsotipos (clones), na qual analisa perfis das

estirpes baseando-se em análises de eletroforese de campo pulsado (PFGE-*Pulsed Field Gel Electrophoresis*).

Diante da grande diversidade de *R. solanacearum*, o conhecimento da estrutura genética populacional dessa bactéria é fundamental para estudos epidemiológicos e o controle efetivo da doença, principalmente para o desenvolvimento de genótipos resistentes.

1.4 *Ralstonia solanacearum* em culturas agronômicas e florestais

A murcha bacteriana foi relatada pela primeira nos Estados Unidos da América, em 1886, por Erwin F. Smith, como *Bacillus solanacearum* e dezoito anos após sua descrição inicial, o próprio autor a reclassificou como *Pseudomonas solanacearum*, que prevaleceu por quase 80 (KELMAN, 1953). Estudos moleculares têm facilitado o entendimento das relações evolutivas neste patógeno resultando em novas classificações de mudança de gênero. Palleroni et al. (1973), em estudo baseado na homologia de sequências do rDNA dividiu o gênero *Pseudomonas* em cinco grupos de espécies. A espécie *P. solanacearum* pertencente ao grupo das não fluorescentes foi considerada como integrante do grupo II. Posteriormente essa espécie foi transferida para o gênero *Burkholderia* por Yabuuchi et al. (1992). Em 1995, com a criação do gênero *Ralstonia*, o agente causal da murcha bacteriana foi reclassificado como *Ralstonia solanacearum*, com base na análise filogenética da sequência de nucleotídeos do gene 16S de rDNA, composição de lipídeos celulares e ácidos graxos (YABUUCHI et al., 1995).

Ralstonia solanacearum é largamente distribuída em todos os continentes e ocorre na maioria das regiões tropicais, subtropicais e quente-temperadas (HAYWARD, 1994). A bactéria tem sido relatada em países como: Belize, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Granada, Guatemala, Guiana, Honduras, Jamaica, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, EUA, Venezuela nas Américas; Etiópia, Líbia, Malawi, Nigéria, Senegal na África e Índia, Filipinas, Indonésia, Malásia, Tailândia e Vietnã (OEPP/EPPO, 2006).

No Brasil, a espécie foi relatada pela primeira vez por Von Parseval em 1922 em fumo e batata no estado do Rio Grande do Sul. Posteriormente, um

grande número de informações sobre a ocorrência da doença em diversas culturas economicamente importantes foram divulgadas (BRINGEL, 2002).

A doença afeta mais de 200 espécies de plantas, englobando aproximadamente 50 famílias botânicas sendo assim considerada uma das mais importantes de origem bacteriana do mundo (HAYWARD, 1991). Culturas de importância econômica como: batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), banana (*Musa ssp.*), fumo (*Nicotiana tabacum*), pimentão (*Capsicum annuum*), berinjela (*Solanum melongena*), pimenta (*Capsicum frutescens*), gengibre (*Zingiber officinale*) e amendoim (*Arachis hipogaea*) são afetadas pela murcha bacteriana. Outras culturas, como: algodão (*Gossypium hirsutum*), mandioca (*Manihot esculenta*), amora (*Morus Alba*), além de diversas plantas daninhas, são hospedeiras da murcha bacteriana (HAYWARD, 1994; MIRANDA et al., 2004).

A ampla distribuição da bactéria, bem como a ampla diversidade de hospedeiros, torna difícil a determinação de sua origem. Kelman et al. (1994), com base em resultados de estudos sobre o ciclo de hospedeiros, rotação de culturas e interações hospedeiro-patógeno, concluiu que populações de *R. solanacearum* evoluíram em diferentes regiões do mundo, em vários membros da flora nativa local.

1.5 O Moko da bananeira

O Moko ou murcha bacteriana da bananeira, causado por *R. solanacearum*, é uma das principais doenças bacterianas da bananeira e helicônia. Esta raça apresenta linhagens com características patogênicas e epidemiológicas diferentes, das quais pelo menos cinco (**A**, **SFR**, **B**, **D** e **H**) são reconhecidas na bananeira (ALVES, 2001). Características destas linhagens são apresentadas na Tabela 1.5.

Tabela 1.5: Características das linhagens de *Ralstonia solanacearum* raça 2

Linhagens	Características
A	A (Amazônia), ocorre nas margens de rios sujeitas a inundações periódicas (Brasil, Peru, Colômbia, e Venezuela) e pode ser facilmente transmitida por insetos.
SFR	SFR (<i>small, fluidal, round</i>) causa murcha rápida em todos os grupos de bananeiras, é transmitida através de insetos visitantes de inflorescência em países da América Central.
B	B (<i>banana</i>) causa murcha rápida em bananeiras
D	D (<i>distortion</i>), isolada de Helicônia spp., causa distorções foliares e murcha lenta em bananeiras.
H	H (<i>Heliconia</i>) é uma estirpe presente na Costa Rica e causa murcha em Plátano sem afetar outras bananeiras.

Alves (2001).

Existem informações de que o Moko surgiu na Guiana por volta de 1840 e posteriormente causou problemas em plantio de Trinidad Tobago. Atualmente, à exceção das Filipinas, a doença está restrita ao hemisfério ocidental, em locais como México, América Central, Colômbia, Peru, Suriname e Brasil (ALVES, 2001).

O Moko da bananeira foi constatado oficialmente no Brasil em 1976 no vale do Rio Pedreiras, no Território Federal do Amapá, e ainda hoje, aparecem focos esporádicos da doença nos estados de Sergipe e Alagoas que são prontamente erradicados (FREIRE et al., 2003). Atualmente a doença vem sendo observada em toda a região Norte, exceto Acre. Seu potencial de dano às plantações de bananeira é enorme, principalmente entre as culturas rústicas de plátano, podendo chegar até a 100% de perdas, em condições favoráveis (MICHEREFF e BARROS, 2001).

1.6 Processo de infecção e mecanismos de patogenicidade de *Ralstonia solanacearum*

A bactéria invade o hospedeiro através de injúrias das raízes ou em pontos de emergência de pelos radiculares e raízes laterais. Existem também evidências de penetração nas folhas via estômatos (HAYWARD, 1991; KELMAN et al., 1994). As injúrias das raízes podem ser causadas por nematóides, implementos agrícolas utilizados nas práticas culturais ou no transplante das mudas, que facilitam a entrada da bactéria nas plantas.

Após a penetração, a bactéria coloniza os espaços intercelulares do córtex da raiz e do parênquima vascular, culminando com a desestruturação das paredes celulares, o que facilita, em uma segunda etapa, a disseminação pelo sistema radicular (VASSE et al., 1995). Nos vasos do xilema, a bactéria rapidamente atinge altos níveis populacionais ($> 1 \times 10^{10}$ ufc. g⁻¹ de tecido fresco), concomitantemente com o aparecimento do sintoma de murcha, seguido da morte da planta (DENNY, 2000; GENIN e BOUCHER, 2002).

Muitos produtos gênicos são necessários para *R. solanacearum* causar doenças aos hospedeiros. Os isolados, K60 (KELMAN, 1954), GMI1000 (BOUCHER et al., 1985) e AW (SCHELL, 1987) foram utilizados para caracterizar os fatores de patogenicidade da bactéria. Esses estudos revelaram que os principais mecanismos que a bactéria utiliza para o processo de infecção, são: (i) exopolissacarídeos (EPS) e enzimas extracelulares e (ii) *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity).

No primeiro grupo, o EPS I é um dos polissacarídeos mais importantes, pois é a principal causa da murcha durante a infecção das plantas. O EPS I bloqueia o sistema vascular e impede o movimento da água (DENNY e BAEK, 1991). Existem também evidências de que EPS I reduz ou evita o reconhecimento da bactéria pelo sistema de defesa da planta hospedeira (BOUCHER e GENIN, 2004). Já as enzimas extracelulares, como a endoglucanase extracelular (Egl), a endopoligalacturonase (Pgl) e a pectina-metil-esterase (PME) são considerados fatores de virulência secundários, pois atuam nas paredes das células da planta, contribuindo para o surgimento mais rápido dos sintomas de murcha da planta hospedeira. Na sua ausência, a taxa de progresso da doença nas plantas

infectadas é maior (COPLIN e COOK, 1990; ALLEN et al., 1992; DENNY et al., 1994.; HUANG et al., 1993).

Os genes *hrp* são necessários para a patogenicidade em espécies hospedeiras e também para a indução de resposta hipersensível (HR) em plantas não hospedeiras (BOUCHER et al., 1987). Estes genes fazem parte do sistema de secreção Tipo III em bactérias (VAN GIJSEGEM et al., 1993)

Adicionalmente, existe um complexo processo de regulação gênica que responde a sinais múltiplos, responsável por controlar a produção de outros determinantes de virulência de *R. solanacearum* (SCHELL, 2000).

O sequenciamento completo do genoma de *R. solanacearum* (GMI1000) concluído recentemente torna-se o ponto de partida para compreender toda a análise funcional e os determinantes de patogenicidade deste importante fitopatógeno (SALANOUBAT et al., 2002).

1.7 Sintomas do Moko da bananeira

As características dos sintomas do Moko da bananeira dependem da idade da planta, da cultivar, estirpe do patógeno envolvido e das condições ambientais. Podem se manifestar em qualquer estágio de desenvolvimento das plantas e atingir todas suas partes (Figura 1.5) (AKIEW e TREVORROW, 1994).

Em plantas jovens a doença caracteriza-se por uma coloração verde-pálida ou amarelada em uma das três folhas mais novas e a quebra próximo a junção do limbo com o pecíolo ou na nervura principal, mesmo antes de manifestarem amarelecimento. Em plantas adultas, na fase de desenvolvimento final do cacho, pode-se observar o desenvolvimento anormal dos rebentos, caracterizado pelo crescimento retorcido e morte destes (CORDEIRO, 2000; ALVES, 2001). No pseudocaule, ocorre o escurecimento vascular de coloração pardo-avermelhado intensa, atingindo principalmente a região central. No rizoma, o escurecimento ocorre na região central, bem como na área de conexão do rizoma principal com o rizoma das brotações. Na ráquis feminina e masculina pode ocorrer escurecimento vascular, na forma de pontos vermelhos dispostos uniformemente.

Nos frutos, os sintomas caracterizam-se por escurecimento da polpa, seguido de podridão seca, sendo a presença de frutos amarelos em cachos verdes um forte indicativo da presença da doença. As plantas infectadas exsudam

pus bacteriano logo após o corte de órgãos, o que resulta em uma importante fonte de inóculo para a disseminação da doença (FERREIRA e SALGADO, 1995; AGRIOS, 1997).

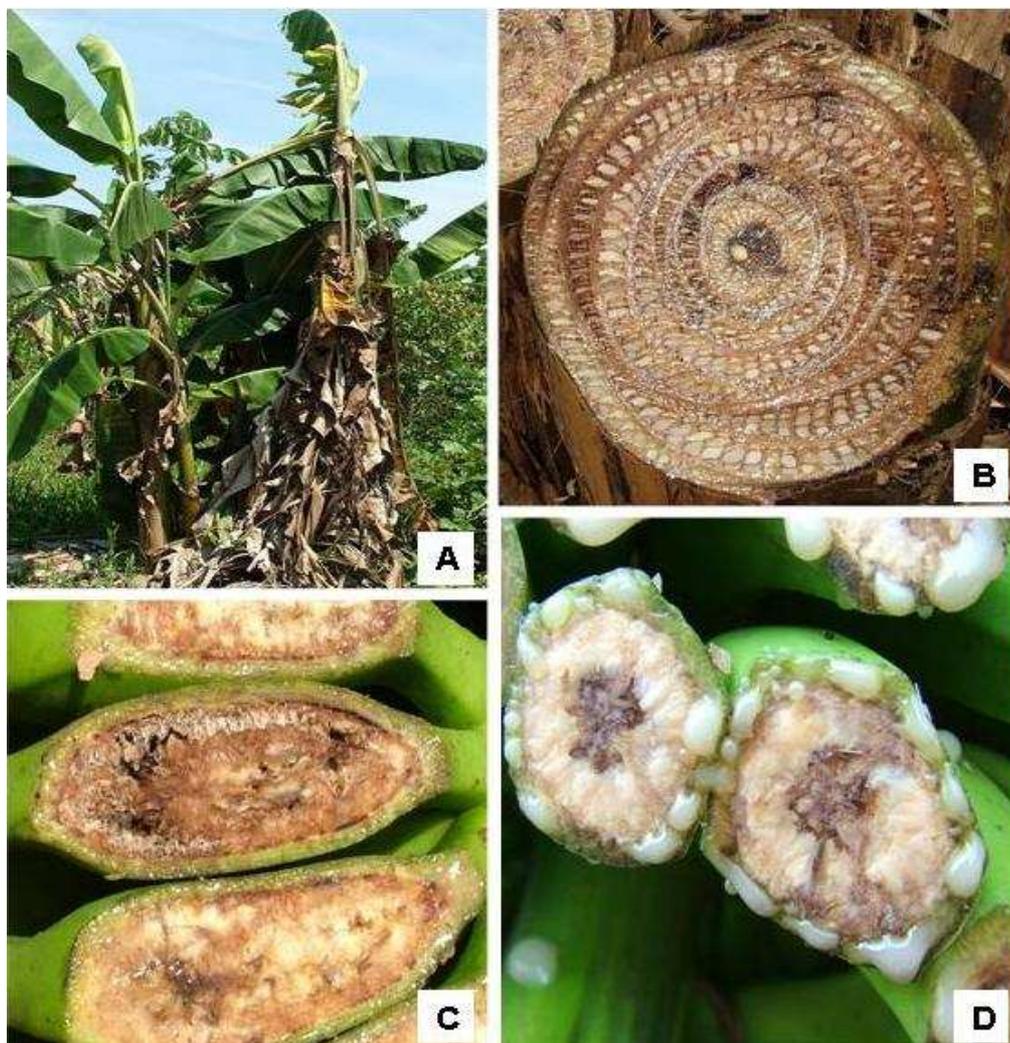


Figura 1.5: Sintomas do Moko da bananeira. **A-** Planta adulta, mostrando quebra do pecíolo junto ao pseudocaule; **B-** Escurecimento vascular de coloração pardo-avermelhada no pseudocaule na região central e periferia; **C-** Escurecimento da polpa do fruto seguido de podridão seca; **D-** Exsudação de pus bacteriano em frutos afetados. Fotos: Miguel Angel Dita Rodríguez.

Um modo rápido de se constatar a presença de *R. solanacearum* nos tecidos das plantas, e assim confirmar ocorrência do Moko, é promover o corte longitudinal de um local afetado e, utilizando um recipiente transparente com água até dois terços de sua altura, introduzir o material, fazendo-o penetrar ligeiramente na água. Dentro de aproximadamente um minuto, caso a planta esteja infectada, ocorrerá à liberação de um fluxo bacteriano (ROMEIRO, 2001).

1.8 Controle do Moko da bananeira

O controle do Moko da bananeira é extremamente difícil, especialmente quando as condições ambientais são favoráveis à doença e também devido à complexidade que envolve a sobrevivência do patógeno no solo e seus hospedeiros alternativos (HAYWARD, 1991; KIMATI et al., 2005).

Considerada uma praga quarentenária A2, a base principal do controle do Moko é a detecção precoce da doença e a rápida erradicação tanto das plantas infectadas como daquelas que lhe são adjacentes, as quais embora aparentemente saudáveis possam estar infectadas. É importante que a área erradicada permaneça limpa, sem plantas daninhas, durante o período de pousio, que deve durar 12 meses. Em plantações abandonadas devido ao Moko, todas as espécies de *Musa* spp. e *Heliconia* spp. devem ser eliminadas (MANICA, 1997).

A erradicação pode ser feita mediante a aplicação de herbicidas como glifosato a 50%, injetado no pseudocaule ou introduzido por meio de palitos embebidos na suspensão. O produto deve ser aplicado em todas as brotações existentes na touceira (3 a 30 mL por planta, dependendo de sua altura) (ALVES, 2001).

O sucesso no controle depende de vários fatores, tais como: variante do patógeno no local, modos de transmissão e sobrevivência, tratamentos culturais, condição ambiental e grau de resistência da cultivar (HAYWARD, 1991). Medidas adicionais são importantes como a eliminação do coração assim que as pencas tiverem emergido em cultivares com brácteas caducas, visando impedir a transmissão por insetos (ALVES, 2001).

O uso de variedades resistentes seria o método de controle mais adequado, porém as variedades atualmente disponíveis são altamente sensíveis ao Moko e não se conhecem fontes de resistência natural (SILVA et al. 2004). Uma possível explicação que limita a obtenção de genótipos resistentes via melhoramento convencional é devido à variabilidade genética das estirpes do patógeno e por alterações climáticas em diferentes regiões geográficas (TUNG et al., 1990).

O advento da engenharia genética e a transformação de plantas abriram novas perspectivas para o controle de doenças de plantas mediante a obtenção de

plantas expressando proteínas de resistência. O desenvolvimento de plantas transgênicas, contendo genes que codificam para proteínas e/ou peptídeos antibacterianos têm sido uma das formas estudadas para controlar murchas bacterianas em plantas (JIA et al., 1998; BOSHOU, 2005). Neste sentido, o Programa Nacional de Melhoramento Genético de Bananeira, conduzido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em acordo institucional com o NIAS (National Institute of Agrobiological Science, Tsukuba, Japão), desenvolveu pesquisas visando à obtenção de plantas resistentes ao Moko da bananeira. Esses estudos foram focados na transformação genética, utilizando o gene *stx*, isolado de *Sarcophoga peregrina* (Mosca varejeira) que codifica para a sarcotoxina IA, um peptídeo com comprovada ação antibacteriana.

1.9 Peptídeos antimicrobianos e sua aplicação na obtenção de plantas transgênicas

Diversos organismos utilizam peptídeos com atividade antimicrobiana como componentes de suas estratégias de defesa. Peptídeos hidrofóbicos e anfipáticos, produzidos por organismos como bactérias, fungos, insetos, anfíbios, plantas e vertebrados apresentam atividade antimicrobiana através da sua interação com membranas de células vivas (BECHINGER, 1997).

Os insetos não são capazes de produzir anticorpos específicos, ainda assim, pertencem ao grupo que tem mais êxito em termos de sobrevivência e domínio de habitats (RATCLIFFE, 1985). Grande parte desse êxito se deve ao fato de possuir um eficiente mecanismo de defesa, no qual os peptídeos antibacterianos assumem um papel decisivo. Nos insetos, os peptídeos antimicrobianos são produzidos no corpo gorduroso (equivalente ao fígado em vertebrados) e nos hemócitos (BULLET et al., 1999; GILLESPIE et al., 1997; HETRU et al., 1998). Esse sistema, que foi bastante estudado em *Hyalophora cecropia*, é responsável pela produção de peptídeos com potente atividade antibacteriana, a exemplo do grupo conhecido como cecropinas (BOMAN e STEINER, 1981).

Visando aumentar a resistência de plantas a doenças bacterianas, várias estratégias têm sido utilizadas pela engenharia genética. Entre essas estratégias, o uso de peptídeos antimicrobianos, por suas características estruturais e

funcionais, assim como por sua baixa toxicidade para células eucarióticas, tem mostrado grande potencial para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a doenças. Mais de 500 tipos de peptídeos com essas características têm sido descritos (ZASLOFF, 2002; MONTESINOS, 2007).

Estruturalmente, esses peptídeos possuem de 35 a 37 aminoácidos, são α -helicoidal, apresentam uma região N-terminal bastante básica e uma longa sequência hidrofóbica na região C-terminal. Essas características são necessárias para a formação de canais de íons nas membranas plasmáticas, que provoca o vazamento de componentes celulares e, conseqüentemente, a morte das bactérias (REDDY et al., 2004).

Vários trabalhos de transformação genética em espécies vegetais com peptídeos antibacterianos foram publicados nos últimos anos. Batata (*Solanum tuberosum*) e fumo (*Nicotiana tabacum*) foram as espécies mais utilizadas, principalmente pela facilidade de transformação genética e a importância das bacterioses. Montaneli e Nascari (1991) transformaram batata utilizando genes responsáveis pela produção de cecropina e encontraram resultados positivos contra *R. solanacearum* em testes preliminares *in vitro* com extratos de plantas transgênicas. Jaynes et al. (1993), utilizando o gene *Shiva-1*, um análogo sintético da cecropina, obtiveram alta expressão em plantas transgênicas de fumo que mostraram um aumento de resistência a *R. solanacearum*. Estudos realizados visando observar o crescimento de *Xylella fastidiosa in vitro*, utilizando meio de cultura baseado no fluido do xilema de videiras, acrescido de cecropina sintética, demonstram que esses peptídeos são bastante potentes contra esta bactéria (ANDERSEN, et al. 2004).

Contudo, Florack et al. (1995) não conseguiram aumentar a resistência contra *R. solanacearum* e *P. syringae* pv. *tabaci*, em fumo transformado com genes de cecropina B. Os autores apontaram a rápida degradação da cecropina por proteases endógenas como a causa da baixa expressão.

Os resultados até agora obtidos indicam que a transformação com peptídeos antibacterianos tem grande potencial para ser usada no melhoramento vegetal, principalmente através do uso de construções gênicas capazes de expressar esses peptídeos no espaço extracelular e com maior estabilidade frente à degradação por proteases (BESPALHOK FILHO et al., 2001). Assim, o uso de análogos do gene que apresentam uma estrutura estável é mais adequado.

Harakava (2000) utilizou um gene análogo a cecropina B (*cecropin MB39*) para a construção de um vetor para a transformação de plantas, sendo este mais estável à ação de enzimas da planta.

Experimentos *in vitro* têm mostrado que a cecropina e seus análogos são altamente tóxicas para bactérias patogênicas. Geralmente, concentrações menores que 5 μ M são suficientes para inibir o crescimento de bactérias dos gêneros: *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Xanthomonas* (NORDEEN et al., 1992).

Ishida et al. (2004) demonstraram que a cecropina B apresentou uma grande atividade antibacteriana contra pequenos agregados de *Xylella fastidiosa* em experimentos *in vitro*. Azevedo (2005) transformou os principais cultivares de laranja doce com o gene *cecropin MB39*, e obteve em testes preliminares, uma maior resistência a *Xanthomonas anoxopodis* pv. *citri*. Outro peptídeo antibacteriano utilizado em experimentos de transformação é a atacina, utilizado em plantas transgênicas de maçã e citros. A expressão deste gene proporcionou maior resistência a *Erwinia amylovora* (NORELLI et al., 1994), e *X. anoxopodis* pv. *citri* (BOSCARIOL, 2004), respectivamente. Uma revisão completa sobre o uso de peptídeos antimicrobianos visando a resistência a doenças em plantas pode ser recentemente publicada por Montesinos (2007).

Dentre os peptídeos antibacterianos conhecidos, a sarcotoxina (grupo das cecropinas), isolado de larvas de *S. peregrina*, é um dos peptídeos com eficiência comprovada na inibição de diferentes bactérias fitopatogênicas (ALY et al. 1999; OHSHIMA et al. 1999; MITSUHARA et al. 2000). O uso potencial deste peptídeo na obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças bacterianas já foi comprovado em fruteiras, a exemplo de laranja (BESPALHOK FILHO et al., 2001; de PAOLI et al. 2007) e maçã (SOEJIMA et al., 2000).

Resultados obtidos em outros patossistemas indicam que o uso da sarcotoxina IA em bananeira teria potencial para o controle do Moko. Trabalhos realizados na Embrapa Mandioca e Fruticultura resultaram em plantas de bananeira cultivar Terra Maranhão transformadas com o gene *stx*. Entretanto, a inserção e número de cópias do gene *stx* precisam ainda ser determinadas. Adicionalmente, informações sobre fenótipo da resistência ao Moko e efeito da expressão desse peptídeo sobre a população de microrganismos endofíticos e ou associados à rizosfera, precisam também ser geradas.

Um aspecto pouco estudado em plantas transgênicas expressando proteínas de amplo espectro antimicrobiano é a ação destas sobre a população de microrganismos endofíticos ou associados à rizosfera. Nesse sentido, cabem as seguintes perguntas: plantas transgênicas expressando constitutivamente peptídeos antimicrobianos de amplo espectro têm efeito sobre a população de microrganismos não alvos, que normalmente fazem parte da sua flora endofítica ou rizosférica? Caso esse efeito exista, quais seriam as consequências para equilíbrio microbiológico dessas plantas? Teria a diminuição de microrganismos associados a essas plantas um efeito significativo sobre o comportamento frente a estresses bióticos e/ou abióticos?

Heuer et al. (2002) analisando a comunidade microbiana associada a rizosfera de plantas de batatas transformadas com o gene da lisozima (um peptídeo antimicrobiano), observaram que não houve diferenças significativas entre plantas transformadas e não transformadas. Todavia, Ahrenholtz et al. (2000) relataram um decréscimo de *Bacillus subtilis* na rizosfera de plantas de batatas transformadas com o mesmo peptídeo. Trabalhos de pesquisa direcionados a responder essas perguntas são ainda escassos visto que não existe ainda um consenso a respeito dos efeitos de plantas geneticamente modificadas sobre as comunidades microbianas, pois, tanto efeitos neutros como negativos tem sido reportados (KOWALCHUK et al., 2003; DUNFIELD; GERMIDA, 2004). Realizar este tipo de estudos em culturas como a bananeira, onde a importância da comunidade de microrganismos endofíticos na proteção contra doenças tem sido relatado (SMITH et al., 1998), são essenciais.

CAPÍTULO 2

Caracterização molecular e fenotípica da bananeira cultivar Terra transformada com o gene *stx*

RESUMO

Brito, M. R. Caracterização molecular e fenotípica da bananeira cultivar Terra transformada com o gene *stx*.

Muitas doenças afetam a bananicultura, a exemplo do Moko, causada pela raça 2 de *Ralstonia solanacearum*. O controle da doença baseia-se no uso de variedades resistentes, porém ainda não se conhecem fontes de resistência natural. Nesse sentido, pesquisas realizadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura geraram diferentes eventos de transformação da cultivar Terra Maranhão (AAB) transformadas com o gene *stx*, que codifica para a sarcotoxina IA. O presente trabalho objetivou caracterizar esses transformantes fazendo análises comparativas com plantas não transformadas. Inicialmente foram realizados estudos visando confirmar a inserção e número de cópias do gene *stx*. Posteriormente foi realizada a caracterização dos transformantes quanto aos aspectos morfológicos, ao efeito da inserção do gene *stx* sobre a população de microrganismos, e a resistência dos transformantes quanto ao Moko. Através de análises de Southern blot foi possível confirmar a inserção do transgene. Somente o evento 27::1 mostrou um perfil diferente quanto ao número de cópias. Embora as análises morfológicas revelassem a presença de três grupos diferentes, esta variabilidade não foi associada à transgenia. Não foi detectada diferença entre plantas transformadas e não transformadas quanto à população de fungos avaliados. Contudo, houve uma redução significativa da população de bactérias endofíticas nas raízes de plantas transformadas sugerindo um potencial efeito da sarcotoxina IA sobre esses microrganismos. Apesar de verificadas diferenças quanto à reação de resistência a *R. solanacearum* em termos de redução de taxa de progresso da doença e valores finais de severidade, não foi possível observar um efeito significativo na redução dos sintomas de Moko de bananeiras transgênicas expressando peptídeos antimicrobianos no Brasil. Os resultados obtidos, apesar de parciais, abrem novas perspectivas sobre o potencial e riscos de uso deste tipo de genes na agricultura.

Palavras-chaves: Moko da bananeira, *Musa* spp., *Ralstonia solanacearum*.

ABSTRACT

Brito, M. R. Phenotypic and molecular characterization of banana cultivar Terra transformed with the *stx* gene.

Banana and plantain production is affected by several diseases, such as the Moko, caused by *Ralstonia solanacearum* race 2. The disease control is based on resistant varieties, but natural sources of resistance are not known. Accordingly, transformation experiments were done at Embrapa Cassava and Tropical Fruits to generate different events of Terra Maranhão (AAB) cultivar with the *stx* gene, coding for sarcotoxina IA. This study aimed to characterize these transformants comparing them with untransformed plants. Firstly studies were performed to confirm insertion and number of copies of the *stx* gene. Afterwards were done the transformants characterization based on morphology, on the effect of the insertion of *stx* gene on the population of microorganisms and the resistance of transformants to the Moko. The Southern blot analysis confirmed the transgene insertion. Only one event 27::1 showed a different profile of copy number. Despite that the morphological analyzes ranked the genotypes in three different groups, it was not considered as changes induced by the transgene insertion, but as normal variability of the used parameters. Differences between transformed and wild type plants regarding reduction of fungal population were not observed. However, there was a significant reduction in the endophytic bacterial population in the roots of transformed plants suggesting a putative effect of sarcotoxina IA on these microorganisms. Despite the differences in terms of Moko disease progress rate and severity verified, it no significant effect of *stx* on Moko intensity reduction was observed. Although these results obtained are preliminary, it opens up new prospects of potential and risks of using antimicrobial wide-spectrum genes to produce disease resistant cultivars for agricultural purposes.

Keywords: Banana Moko disease, *Musa* spp., *Ralstonia solanacearum*.

2.1 INTRODUÇÃO

A banana é a segunda fruta mais produzida no Brasil. De acordo dados da FAO o Brasil ocupou a quarta posição no *ranking* mundial em produção, com uma área plantada de 513 mil hectares e responsável por 7,11 milhões de toneladas produzidas, precedido pela Índia com 23,2 milhões de toneladas, Filipinas com 8,6 milhões e China com 8 milhões (FAO, 2008). Entretanto, apesar da grande área plantada quando comparado a países como Filipinas e China, é evidente a baixa produtividade da bananicultura nacional. Fatores ambientais adversos, práticas culturais inadequadas e principalmente problemas fitossanitários têm contribuído para este fato.

A murcha bacteriana ou Moko da bananeira, causada pela raça 2 de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (YABUUCHI et al., 1995) é uma das principais doenças bacterianas da cultura, principalmente em climas úmidos, com altitudes baixas e médias, em regiões tropicais e subtropicais. Em condições favoráveis, a doença pode causar perdas de até 100% da produção (MICHEREFF e BARROS, 2001).

No Brasil, o Moko da bananeira está presente em quase todos os estados da região Norte e em Sergipe. Os sintomas se apresentam tanto em plantas jovens como adultas e podem aparecer em todas as partes da bananeira. A bactéria provoca infecção sistêmica sendo o nível de severidade dependente da cultivar envolvida, condições ambientais e agressividade do isolado (AKIEW e TREVORROW, 1994). O patógeno se dissemina através de contatos inter-radulares e ferramentas contaminadas. Quando plantas afetadas atingem a fase de inflorescência insetos visitantes constituem eficientes veículos de disseminação (KIMATI, 2005).

Ralstonia solanacearum é uma espécie altamente complexa e heterogênea. Um grande número de dados nos últimos anos através da caracterização quimiotaxonômica e molecular do patógeno contribuíram para aumentar os conhecimentos sobre seus aspectos evolutivos. Apesar disso, poucos avanços foram registrados em relação à epidemiologia, não sendo ainda possível estabelecer estratégias adequadas e seguras de controle dessa doença (COOK e SEQUEIRA, 1994).

O Moko está entre as pragas quarentenárias da bananeira, classificada como tipo A2. O controle deve ser focado na prevenção da entrada da doença em áreas consideradas livres. Após a constatação da doença, a medida a se tomar é a erradicação imediata dos focos, visando impedir o estabelecimento da doença e sua disseminação (MICHEREFF e BARROS, 2001). O uso de variedades resistentes seria a medida de controle mais adequada. Todavia até o momento, não foram constatadas fontes de resistência natural, o que limita a obtenção de genótipos resistentes via melhoramento convencional (SILVA et al. 2004).

Considerando-se a inexistência de fontes de resistência entre os germoplasmas comerciais de banana, o Programa Nacional de Melhoramento Genético da Bananeira, conduzido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, iniciou trabalhos de transformação genética da bananeira com o gene *stx* que codifica para a sarcotoxina IA, visando a obtenção de plantas resistentes ao Moko. A sarcotoxina IA é um peptídeo antimicrobiano isolado da hemolinfa da *Sarcophaga peregrina* (mosca varejeira), que apresenta atividade bactericida contra uma ampla gama de bactérias (ALY et al., 1999; OHSHIMA et al., 1999; MITSUHARA et al., 2000). Esses trabalhos resultaram na geração de eventos de transformação da cultivar Terra Maranhão com construção gênica portando o gene *stx*, sob controle do promotor constitutivo p35S. Esses eventos foram caracterizados quanto à presença do gene *stx* via PCR, mas estudos adicionais visando sua caracterização quanto a outros parâmetros moleculares e fenotípicos precisavam ser realizados.

O presente trabalho objetivou caracterizar em nível molecular e fenotípico eventos de bananeira transgênica cultivar Terra Maranhão. Inicialmente a presença do inserto foi confirmada via análise de Southern Blot (SOUTHERN, 1975). Posteriormente análises comparativas quanto à resistência ao Moko, características morfológicas e população de microrganismos endofíticos foram realizadas.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Todos os experimentos foram realizados com transformantes da variedade Terra Maranhão (AAB) previamente obtidos em experimentos conduzidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Os genótipos foram identificadas da seguinte maneira: 27::1, 27::2, 27::3, 27::4, 27::5, 27::6, 27::7, 27::9, 27::10, 27::11, 27::12, 27::13, 27::15, 31::1, 31::2 e TM (não transformadas). Dependendo dos experimentos foram selecionados apenas alguns transformantes. Como controle foram utilizadas plantas não transformadas submetidas às mesmas condições. Todos os experimentos foram conduzidos seguindo os procedimentos e normativas da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio (www.ctnbio.org) e em instalações credenciadas por essa comissão.

2.2.2 Análises moleculares

As análises moleculares foram realizadas com o objetivo de confirmar a inserção e número de cópias do gene *stx*. Os experimentos foram realizados no laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF) e no centro de Biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

2.2.2.1 Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA total foi realizada conforme o protocolo de Doyle e Doyle (1987), a partir de folhas saudáveis coletadas em plantas acondicionadas em casa-de-vegetação. Após a extração, foi verificada a pureza e a concentração do DNA mediante eletroforese em gel de agarose e medições em espectrofotômetro (GeneQuant Pro - Amersham Biosciences).

2.2.2.2 Análises de Southern blot

Estas análises foram realizadas visando confirmar a integração do gene *stx* e determinar o número de inserções do transgene no genoma das plantas. Como controle positivo foi utilizado um inserto do gene *stx* presente no plasmídeo pST10. Como controle negativo foi usado DNA de plantas não transformadas. A hibridização Southern teve por base o método *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche®) seguindo as recomendações do fabricante. A seguir se descrevem detalhadamente as etapas realizadas.

2.2.2.2.1 Construção da sonda de DNA

A sonda do gene da Sarcotoxina IA foi preparada a partir do produto de amplificação da reação de PCR do vetor pST10 com *primers* específicos para o gene *stx*. O fragmento amplificado de 268 pb, foi submetido a um gel de eletroforese 1% para verificar a presença do amplicon. Após a confirmação da amplificação, o produto do PCR foi purificado com kit *HiYield™ DNA gel/PCR Extraction* (BioAmerica Inc.®) seguindo instruções do fabricante. No último passo da purificação, o DNA foi eluído da coluna com 30 µL de água ultrapura estéril. A qualidade da purificação foi analisada novamente em gel de agarose a 1%. A concentração obtida foi determinada em espectrofotômetro.

Uma alíquota de 1 µg de DNA do produto de amplificação do gene *stx* foi desnaturada a 100 °C durante 10 minutos e colocada rapidamente em gelo durante 5 minutos. A seguir adicionou-se 4 µl de *Dig-High Prime*, misturou-se rapidamente, centrifugou-se durante 15 segundos e incubou-se a mistura a 37°C por 20 horas. A reação foi finalizada aquecendo a amostra (65°C durante 10 minutos). A sonda foi conservada a -20°C até sua utilização.

2.2.2.2.2 Transferência de DNA para membrana

Amostras de 50 µg de DNA foram submetidas à reação de digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, durante 14h a 37°C. Esta enzima corta o T-DNA apenas uma vez e não corta a sequência do gene, o que possibilita que o número

de eventos de inserção do gene no genoma da planta analisada seja identificado (Figura 2.2.1).

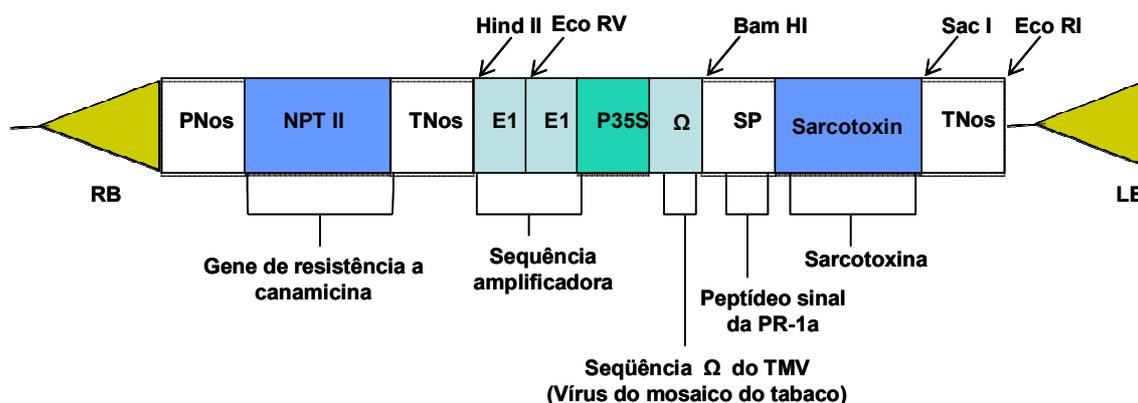


Figura 2.2.1: Diagrama do T-DNA da construção gênica do plasmídeo pST10 utilizado para a transformação de bananeira cultivar Terra Maranhão. **LB** – borda esquerda; **RB** – borda direita; **PNos** – promotor da nopalina sintase; **NPT II** – gene que confere resistência à canamicina; **TNos** – terminador na nopalina sintase; **p35S** – promotor constitutivo do vírus do mosaico da couve flor; **E1** – sequência amplificadora; **Ω** – Sequência Ω do TMV; **Sarcotoxina** – gene *stx* que codifica o peptídeo de ação antibacteriana sarcotoxina IA de *Sarcophoga peregrina*.

Após a digestão, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) em tampão TAE 1 X (10 horas, 40 Volts). Concluída a etapa de corrida o gel foi fotografado juntamente com uma régua fluorescente transparente. A seguir foi realizada a depuração, desnaturação e neutralização. Inicialmente o gel foi imerso em solução de depuração (HCl 0,25 M) por 10 minutos. O gel foi lavado uma vez com água destilada e em seguida foi adicionada solução desnaturante (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 30 minutos. Após realizar uma segunda lavagem com água destilada, foram realizadas duas lavagens de 15 minutos com solução neutralizante (NaCl 1,5 M e Tris HCl 1 M). Todas as etapas acima mencionadas foram realizadas sob agitação lenta.

A transferência do DNA do gel para membrana (*Hybond-N⁺*, Amersham Biosciences) foi realizada seguindo o princípio de capilaridade (SAMBROOK et al., 1989). Para tal, foi utilizada uma “ponte” de papel *Whatman* 3 mm embebido em solução SSC 10 X através de um sistema baseado no arraste hidrodinâmico capilar (técnica denominada blot). A transferência durou 36h.

Após a transferência, o sistema foi desmontado, a membrana retirada cuidadosamente e mergulhada em solução 6 X SSC por 5 minutos, em seguida secado em temperatura ambiente por 30 minutos. Para verificar a eficiência da

transferência o gel foi imerso em tampão TAE 1X com brometo de etídio por 40 minutos. Após esse período o gel foi fotografado confirmando a transferência. A seguir o DNA foi fixado à membrana por exposição aos raios UV, utilizando um forno *Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker* (30 segundos na função de Auto Cross-Link). As membranas foram identificadas e armazenadas a 4 °C até a realização da hibridização.

2.2.2.2.3 Hibridização e detecção

O processo de hibridização foi realizado seguindo as recomendações do fabricante. Quinze mililitros de *Dig Easy Hyb* foram aquecidos em tubo de hibridização (*Fisher-Scientific*) à temperatura de hibridização (47°C). A membrana foi colocada no interior de um tubo e pré-hibridizada durante 30 minutos, em uma incubadora *Isotemp*[®] *Fisher-Scientific* a 47°C, 70 rpm. A seguir, desnaturou-se a sonda previamente preparada e adicionou-se a sonda desnaturada a *Dig Easy Hyb* (3,5 ml/100 cm² membrana), também previamente aquecida à temperatura de hibridização. Após a mistura a solução sonda foi armazenada a -20°C, sendo desnaturada a 68°C durante 10 minutos antes de cada uso. No processo de hibridização a solução sonda foi adicionada imediatamente à membrana que foi e incubada durante 16 horas a 47°C e 70 rpm. Concluída a hibridização, a membrana foi lavada duas vezes à temperatura ambiente sob constante agitação durante 5 minutos com a solução 2× SSC + 0,1% (p/v) SDS e depois lavada duas vezes a 68°C sob constante agitação durante 15 minutos com a solução 0,5 X SSC + 0,1% (p/v) SDS. Após as lavagens e secagem, a membrana foi utilizada imediatamente na detecção ou armazenou-se a 4°C.

Para a detecção, a membrana foi lavada durante 5 minutos em tampão de lavagem e de seguida incubada durante 30 minutos em 200 ml de solução bloqueadora. Depois, foi incubada durante 30 minutos em 40 ml de solução anticorpo e após esta incubação lavou-se a membrana duas vezes durante 15 minutos com 100 ml de tampão de lavagem. Todas as incubações foram levadas a cabo à temperatura ambiente com agitação. Por último, colocou-se a membrana em 20 ml de tampão de detecção. Em seguida, a membrana foi armazenada em um recipiente com a face de transferência de DNA voltada para cima, e então se aplicou 1 mL de *CSPD ready-to-use* sobre a mesma. Posteriormente, com ajuda

de uma pinça, foi colocada sobre uma folha de plástico transparente tipo de retroprojektor, uma segunda folha foi sobreposta. Com o auxílio de papel toalha, o *CSPD ready-to-use* foi distribuído homogeneamente por toda a membrana e o excesso retirado. Para aumentar a reação de luminescência, a membrana foi incubada por 10 minutos a 37 °C. A seguir, o filme de autoradiografia foi exposto sobre a membrana hibridizada utilizando um cassete de raios X. A revelação foi realizada utilizando solução reveladora (Kodak) por 60 segundos, água por 30 segundos, solução fixadora (Kodak) por 60 segundos e novamente em água por 30 segundos.

2.2.3 Caracterização morfológica

Com o objetivo de verificar se o gene que codifica para a Sarcotoxina IA interfere nos aspectos fenotípicos das plantas, estudos de caracterização morfológica e agrônômica foram realizados. Foram utilizados 15 transformantes e plantas controle, acondicionados em casa-de-vegetação da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. A caracterização foi baseada nos descritores morfológicos da cultura de bananeira, segundo o Catálogo de Germoplasma dessa cultura (SILVA et al., 1999). Foram avaliadas características tanto quantitativas quanto qualitativas.

2.2.3.1 Características quantitativas:

- 1) **Altura da Planta (APL):** realizado com auxílio de uma fita métrica desde o nível do solo até o ponto de saída do engajo, sendo o resultado expresso em metro.
- 2) **Diâmetro do Pseudocaule (DIA):** esta medida foi obtida com o uso de um paquímetro a uma altura de 15 cm do solo, expressando-se o resultado em centímetro.
- 3) **Comprimento do Pecíolo da folha número 3 (CPC):** Esta medida foi obtida com uma fita métrica, posicionada desde o ponto de saída da folha no pseudocaule até a base do limbo, resultado expresso em centímetro.
- 4) **Diâmetro Médio do Pecíolo da folha número 3 (DIP):** A medida dessa variável foi obtida com um paquímetro, por meio de três avaliações no pecíolo:

início, meio e fim, e depois calculado a média dos valores obtidos, o resultado foi expresso em centímetro.

- 5) Comprimento do Limbo da folha número 3 (CPL):** Foi realizada com uma fita métrica posicionada da base até o ápice do limbo. O valor obtido foi expresso em centímetro.
- 6) Largura máxima do limbo da folha número 3 (LML):** Foram realizadas várias medidas na região mediana da folha e a maior delas foi escolhida. O resultado foi expresso em centímetros.

2.2.3.2 Características qualitativas

- 1) Tonalidade da Cor Verde do pseudocaule (TCV):** Pálida (1), Amarelada (2), Clara (3), Escura (4).
- 2) Densidade das Manchas Escuras do pseudocaule (DME):** Contínua (1), Alta (2), Difusa (3), Discreta (4), Baixa (5), Muito Baixa (6)
- 3) Antocianina Externa do pseudocaule (AEX):** Contínua (1), Forte na Base da Planta (2), Média (3), Ausente (4)
- 4) Cor Interna das Bainhas (CIB):** Púrpura (1), Vermelha (2), Rosada (3), Pálida (4), Verde (5).
- 5) Posição das Folhas (PDF):** Ereta (1), Pendente (2), Arcada (3)
- 6) Forma da Margem do Pecíolo (FMA):** Bem Aberta (1), Pouco Aberta (2), Ereta (3), Pouco Fechada (4), Fechada (5).
- 7) Cor das Margens do Pecíolo (CMA):** Púrpura (1), Vermelho-Rosada (2), Verde (3), Marrom (4)
- 8) Cor da Face Dorsal da Nervura Principal (CDN):** Muito Colorida (1), Pouco Colorida (2), Verde (3)
- 9) Cor da Face Ventral da Nervura Principal (CVN):** Púrpura (1), Vermelha (2), Rosada (3), Verde (4)
- 10) Cerosidade do Limbo na Superfície Ventral (CERv):** Muita (1), Média (2), Pouca (3).

2.2.4 Análises microbiológicas

O estudo foi realizado no intuito de verificar os potenciais efeitos do uso de plantas transgênicas expressando peptídeos antimicrobianos sobre a microbiota associada, principalmente sobre os microrganismos endofíticos e também visando obter plantas resistentes ao Moko. Todos os procedimentos foram realizados em casa-de-vegetação e laboratórios de Fitopatologia e Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. A inoculação com *R. solanacearum* foi realizada nas dependências da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

2.2.4.1 Isolamento e quantificação de bactérias endofíticas associadas ao sistema radicular

2.2.4.1.1 Estudos com plantas *in vitro*

Raízes de plantas de bananeira *in vitro* foram coletadas assepticamente. A seguir, fragmentos de raízes foram lavados por três vezes em água destilada estéril e posteriormente triturados em almofariz e pistilos contendo solução salina a 0,85% (MARIANO, 1997; ASSIS, 1998). Visando verificar se as raízes estavam livres de microrganismos epifíticos, foi realizado o plaqueamento de alíquotas da água da última lavagem em meio Agar Nutriente (NA). O triturado de raiz foi deixado em repouso por 15 minutos para difusão das bactérias para a solução salina (ROMEIRO, 2001). Alíquotas de 100 µL da diluição 10^{-1} foram retiradas e transferidas para placas de Petri contendo meio Agar nutriente (NA) e espalhadas com auxílio da alça de Drigalsky. Foram preparadas três placas por diluição de tratamento e acondicionadas em BOD sob fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$. Decorrido 48h, efetuou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

2.2.4.1.2 Estudos com plantas aclimatizadas em casa-de-vegetação

Raízes das plantas de bananeira foram coletadas em casa-de-vegetação e em seguida lavadas cuidadosamente com água corrente com o objetivo de retirar o solo aderido à superfície das raízes. Posteriormente, 3 g de fragmentos de

raízes foram desinfestados superficialmente (álcool 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio 1% por 2 minutos e lavagem em água destilada esterilizada por três vezes). A trituração, plaqueamento e avaliação de microrganismos foram realizadas como descrito em **2.2.4.1.1**.

2.2.4.2 Isolamento de bactérias de substrato rizosférico

Levando em consideração a hipótese de que compostos exsudados pelas raízes das plantas transgênicas podem causar efeitos na microbiota rizosférica, amostras do substrato (Vivatto Slim, Technes[®]) foram coletadas da região rizosférica de plantas transformadas e não transformadas acondicionadas em casa-de-vegetação.

Para o isolamento de microrganismos, 10 g do substrato da rizosfera foram adicionados em 100 mL de solução salina a 0,85% de NaCl e submetidos a agitação constante durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, procedeu-se a diluição seriada de fator até 10^{-2} . Este fator escolhido devido a testes preliminares realizados para verificar a diluição apropriada para uma população entre 30 a 300 UFC (CLARK, 1965). Alíquotas de 100 μ L foram transferidas e espalhadas para placas de Petri contendo meio NA, como descrito anteriormente. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas e então realizadas a contagem de UFC. Amostras de substrato coletadas diretamente das embalagens de substrato foram também processadas como controle do experimento.

2.2.5 Avaliação da resistência a *Ralstonia solanacearum* em condições de casa-de-vegetação

A avaliação dos transformantes quanto à resistência ao Moko foi realizada na Embrapa Tabuleiros Costeiros. Plantas com aproximadamente 30 cm de altura foram inoculadas com suspensão bacteriana do isolado de *R. solanacearum* raça 2, obtido em Sergipe, previamente caracterizado e denominado SE02. O inóculo foi preparado a partir de colônias crescidas por 48 horas a 28°C em meio Kelman. A suspensão foi preparada em água destilada estéril e ajustada para 10^8 ufc.mL⁻¹. Para inoculação, 2,5 mL da suspensão bacteriana foram infiltrados com auxílio de

uma seringa hipodérmica na porção mediana do pseudocaule. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com três repetições por tratamento. Como controle foram utilizadas plantas injetadas com água destilada estéril e plantas nas quais apenas foram realizados ferimentos com a seringa. Plantas das cultivares Prata e sabidamente suscetíveis foram também inoculadas como controle da inoculação.

A partir do segundo dia após a inoculação, até o vigésimo, as plantas foram avaliadas diariamente, utilizando-se uma escala de notas variando de 0 a 5, onde: (0) Planta sem sintoma; (1) Necrose na folha vela; (2) Folhas murchas e verdes; (3) Murcha com clorose; (4) Murcha com clorose intensa e (5) Planta morta.

2.2.6 Processamento de dados e análises estatísticas

Com os dados das avaliações morfológicas foi realizada análise multivariada de agrupamento. Utilizou-se a distância de Cole-Rogers após os dados multicategóricos terem sido ordenados e analisados como variáveis quantitativas discretas (SOKAL e ROHLF, 1962). Os agrupamentos hierárquicos a partir da matriz de distância genética foram obtidos pelo método UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (SNEATH e SOKAL 1973). A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético (SOKAL e ROHLF, 1962). A significância da correlação cofenética foi calculada pelos testes t e de Mantel (1000 permutações) (MANTEL, 1967). Para a obtenção da matriz de distância genética e testes de significância do coeficiente de correlação cofenético foi utilizado o programa Genes (CRUZ, 2008). O dendrograma foi obtido pelo programa Statistica (STATSOFT, 2005).

Os dados obtidos nas análises microbiológicas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelos testes de Scott-Knot (1974) e Tukey a 5 % de probabilidade.

Com os valores de severidade doença foi calculado o índice da doença (ID), segundo a fórmula de McKinney (1923) [$ID = \frac{\sum (\text{grau da escala} \times \text{frequência})}{n^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}}$]. Adicionalmente estimou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (SHANER e FINNEY, 1977). Os dados foram submetidos à análise de variância e os valores

comparados pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa SAS (The SAS Institute Inc., Version 9.0, Cary, NC, Estados Unidos).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Análises moleculares

As análises de Southern blot permitiram confirmar a integração do vetor pST10 utilizando tanto sondas construídas com o gene *stx* quanto com o gene *nptII*. (Figura 2.1).

O evento 27-1 (linha 3) mostrou um padrão de digestão diferente, com maior número de bandas nas duas sondas utilizadas em relação aos outros eventos, que obtiveram perfis semelhantes, de apenas 1-2 bandas. Enquanto que para o gene *stx* foi observada apenas uma banda por evento, para o gene *nptII* foram observadas duas bandas, a exceção do evento 27-15 (linha 13), onde apenas uma banda foi observada.

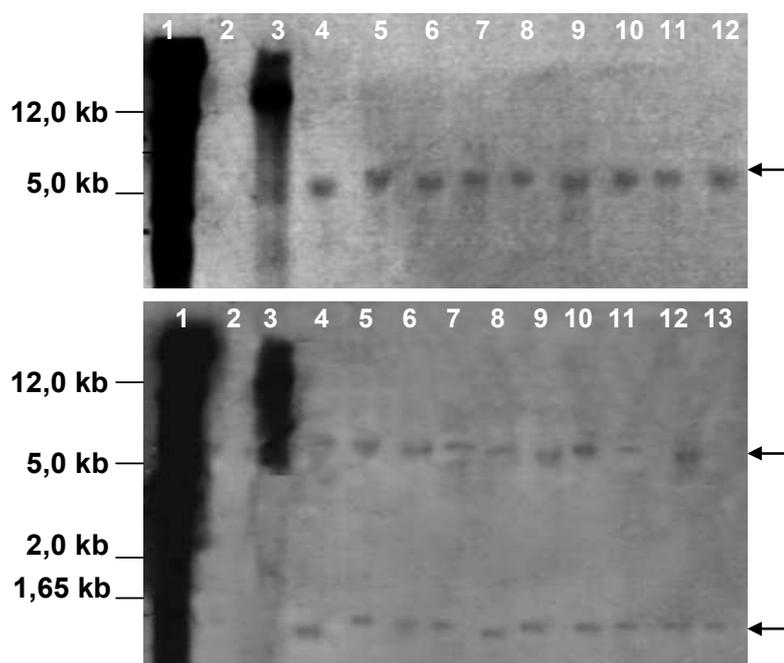


Figura 2.3.1: Fotorradiografia de análises de Southern blot de plantas de bananeira transformadas com a construção psT10 utilizando sondas baseadas no gene *stx* (painel superior) e *nptII* (painel inferior). 1- Controle positivo (plasmídeo psT10), 2- Controle negativo (planta não transformadas); 3- 13 Eventos de transformação (3- 27::1, 4- 27::2, 5- 27::3, 6- 27::4, 7- 27::5, 8- 27::7, 9- 27::10, 10- 27::11, 11- 27:: 12, 12- 27::13, 13- 27::15). Valores no lado esquerdo indicam tamanho em kilobases (kb). Setas no lado direito indicam a presença dos sinais de hibridização.

2.3.2 Caracterização morfológica

Os parâmetros utilizados permitiram a caracterização dos genótipos estudados. Todavia, as análises quantitativas não ofereceram resultados representativos, pelo que não foram consideradas (dados não mostrados).

O coeficiente de correlação cofenética obtido baseados nos parâmetros qualitativos foi de 0,72, indicando uma adequada correlação entre as matrizes de distância e de agrupamento. A análise de agrupamento dos genótipos revelou três grupos de dissimilaridade (Figura 2.3.2).

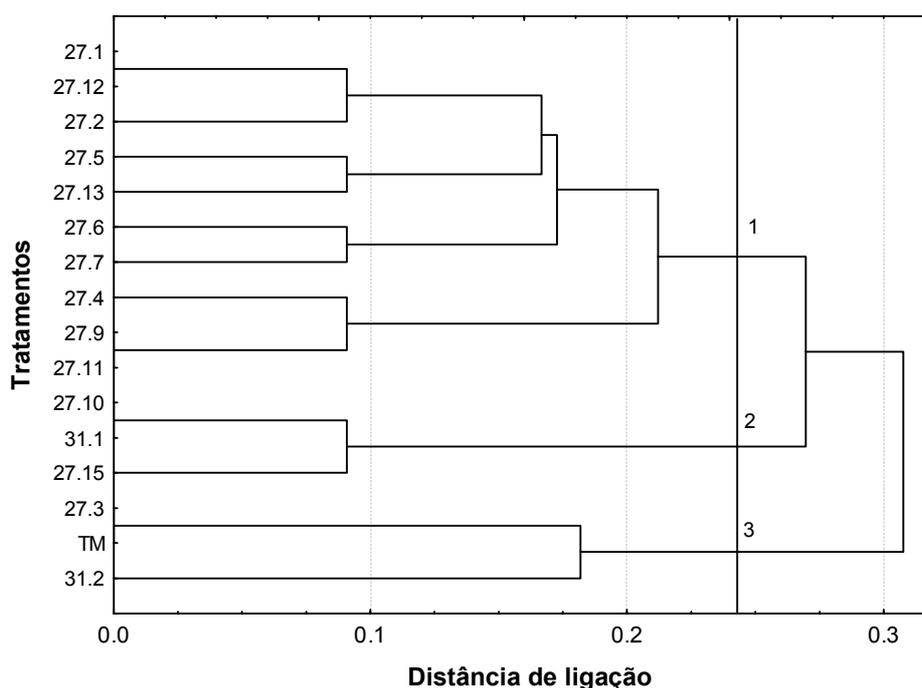


Figura 2.3.2 Dendrograma obtido com base em descritores morfológicos qualitativos de eventos de bananeira transformadas e não transformadas da cultivar Terra Maranhão. Agrupamentos foram realizados utilizando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

No primeiro grupo encontram-se os eventos 27.1, 27.2, 27.4, 27.5, 27.6, 27.7, 27.9, 27.11, 27.12 e 27.13. No segundo, os eventos 27.10, 27.15 e 31.1, e no terceiro os eventos 27.3, 31.2 e as plantas não transformadas (TM) utilizadas como controle para a comparação.

Apenas cinco descritores qualitativos evidenciaram um pequeno grau de polimorfismo, sendo eles: tonalidade da cor verde do pseudocaule, antocianina externa do pseudocaule, forma da margem do pecíolo, cor da margem do pecíolo

e cor da face ventral da nervura principal. Os demais descritores qualitativos analisados apresentaram apenas características monomórficas.

2.3.3 Análises microbiológicas

Nas análises realizadas com plantas *in vitro* não foram detectados microrganismos. Já as análises realizadas com plantas acondicionadas em casa-de-vegetação permitiram caracterizar os genótipos quanto à associação com fungos e bactérias. Nessas condições, não foram verificadas diferenças quanto à presença de fungos (dados não mostrados). Todavia, houve diferenças significativas quanto à associação de bactérias endofíticas, cujo número foi significativamente maior nas plantas não transformadas (Figura 2.3.3A).

Embora em menor intensidade quando comparado com a população de bactérias endofíticas, as análises do substrato rizosférico também revelaram diferenças significativas na população bacteriana entre as plantas transformadas e o controle (Figura 2.3.3B). De maneira similar às análises com plantas, a quantificação de fungos no substrato, não revelou diferenças entre tratamentos.

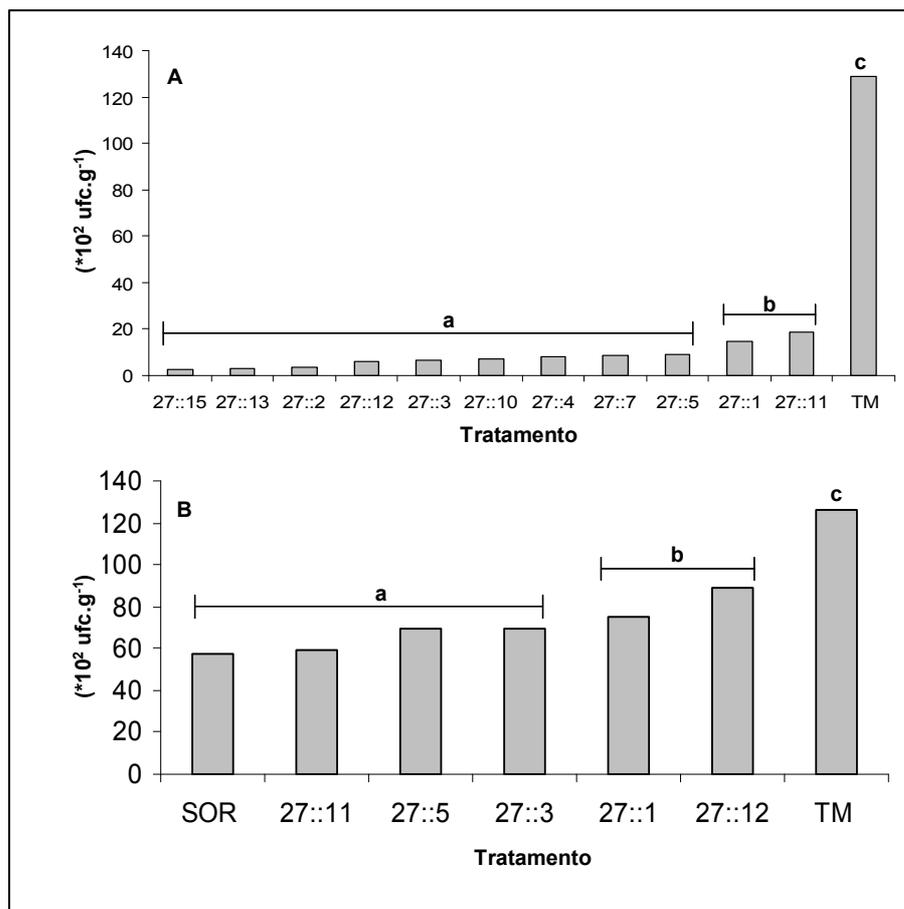


Figura 2.3.3: Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de bactérias isoladas de raízes de plantas de banana cultivar Terra Maranhão transformadas e não transformadas (TM). Valores correspondem à média de UFC de três observações de duas repetições biológicas. **(A)** Bactérias endofíticas isoladas a partir de raízes. **(B)** Bactérias isoladas a partir de substrato rizosférico. TM: plantas sem transformar. SOR: substrato coletado da embalagem sem utilizar. Tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente (Teste de Scott-Knott 5% de probabilidade).

2.3.4 Avaliação da resistência a *Ralstonia solanacearum* em condições de casa-de-vegetação

O método de inoculação utilizado permitiu o desenvolvimento de sintomas da doença em todas as plantas inoculadas. Todavia variações no progresso da doença entre plantas de um mesmo tratamento genótipo foram observadas. Os primeiros sintomas (necrose da folha vela) foram observados aos cinco dias após a inoculação os quais ao longo de 21 dias foram progredindo para uma murcha

com clorose intensa e consequente morte da planta (Figura 2.3.4 e 2.3.5). Não foram observadas diferenças quanto ao período de incubação.

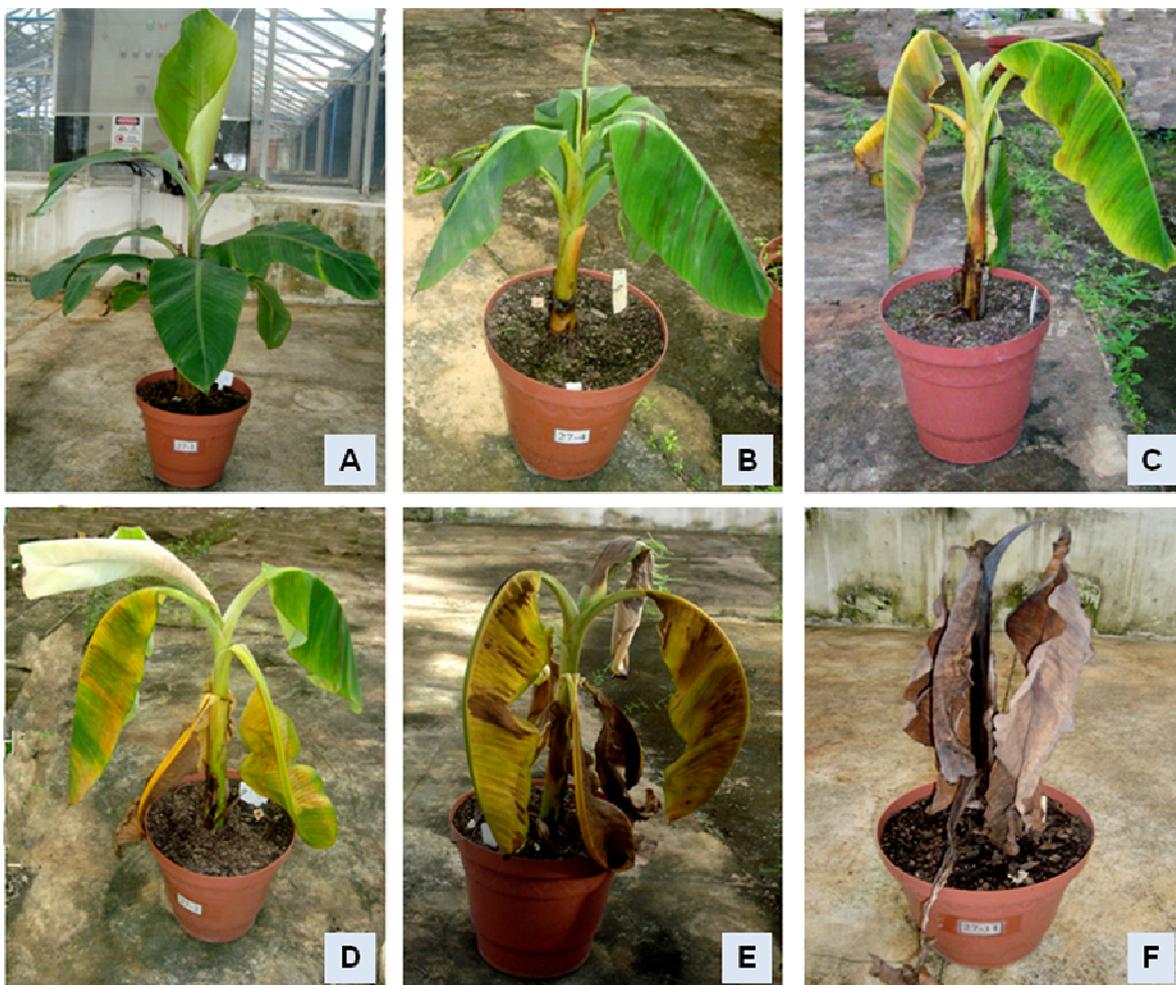


Figura 2.3.4. Plantas de bananeira cultivar Terra Maranhão apresentando diferentes estádios do desenvolvimento de Moko após a inoculação com *Ralstonia solanacearum* raça 2 em condições de casa-de-vegetação. **A**- Planta sem sintomas; **B**- Planta com sintomas iniciais de murcha com folhas ainda verdes. **C** e **D**- Plantas com sintomas de murcha intensa e clorose acentuada; **E**- Planta com murcha e folhas necrosadas; **F**- Planta morta.

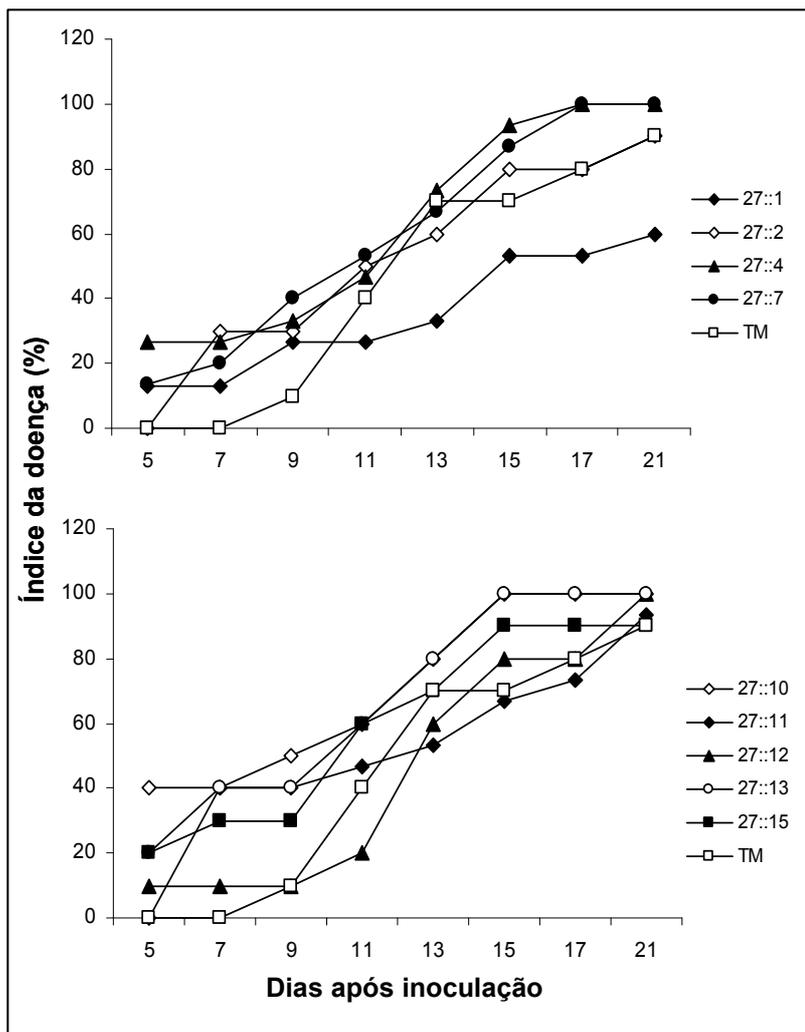


Figura 2.3.5: Índice da doença das plantas de banana cultivar Terra Maranhão transformadas com o gene *stx* (27::1, 27::2, 27::4, 27::7, 27::10, 27::11, 27::12, 27::13, 27::15) e não transformadas (TM) inoculadas com *Ralstonia solanacearum* raça 2 em casa-de-vegetação. Os gráficos foram divididos visando melhor visualização, ambos com TM (plantas sem transformar) como parâmetro de comparação.

As análises comparativas de índice da doença e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) revelaram variações entre tratamentos, porém sem diferenças estatísticas significativas (Figura 2.3.6). Apenas o evento 27::1 revelou valores de AACPD menores do que o resto dos tratamentos.

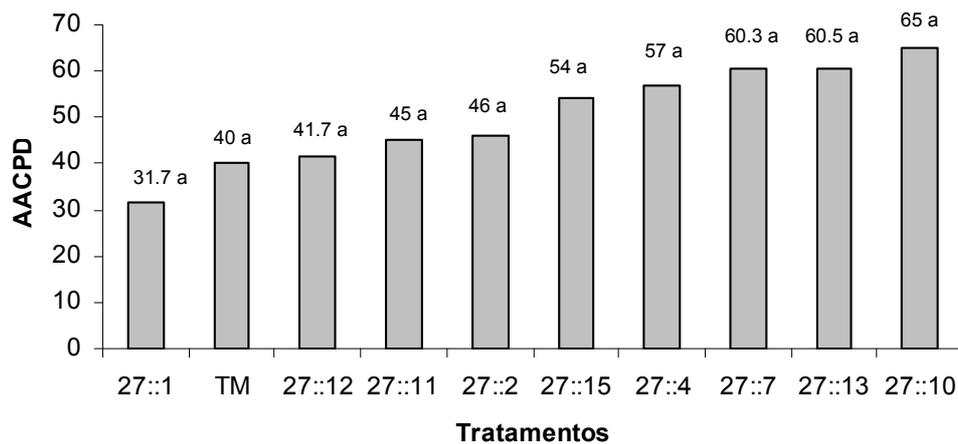


Figura 2.3.6: Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de plantas bananeira cultivar Terra Maranhão transformadas (27::1, 27::2, 27::4, 27::7, 27::10, 27::11, 27::12, 27::13, 27::15) e não transformadas (TM) com o gene *stx* inoculadas com *Ralstonia solanacearum* raça 2 em casa-de-vegetação.

2.4 DISCUSSÃO

A obtenção de plantas geneticamente modificadas (GM) tornou-se uma ferramenta de grande valor, contribuindo nos programas de melhoramento em diferentes espécies vegetais. Apesar da rejeição inicial à tecnologia, o número de espécies GM bem como a área plantada só tende a crescer (ALDERBON et al 2010; FAO, 2008). O uso de plantas transgênicas com genes de peptídeos antibacterianos é uma alternativa de controle a doenças bacterianas onde fontes de resistência natural são escassas e/ou o processo de geração de novas variedades é complexo e demorado, como é o caso do patossistema *Musa spp-Ralstonia solanacearum*. O potencial de uso destes genes visando resistência a bactérias já foi comprovado (MONTESINOS, 2007; CARDOSO et al., 2010; MENG et al., 2010). Entretanto, de maneira similar a outros genes utilizados para a resistência a doenças via transgenia, não existe nenhuma cultura GM comercial que utilize estes genes. Vários são os fatores que influenciam esta adoção, mas entre os principais está a percepção pública e falta de estudos focados em biossegurança tanto humana quanto ambiental. Neste trabalho plantas de bananeira 'Terra Maranhão' transformadas com o gene *stx*, foram caracterizadas visando determinar a inserção e número de cópias do transgene, bem como os possíveis efeitos desta inserção nas características morfológicas, microrganismos associados e finalmente sobre a resistência ao Moko da bananeira.

As análises de Southern blot, confirmaram a ocorrência da inserção do vetor utilizando tanto sondas construídas com o gene *stx* quanto com *nptII*. Todavia os resultados obtidos revelaram um padrão de integração quase idêntico na maioria dos eventos com apenas 1-2 cópias, a exceção do evento 27::1 que mostrou um padrão diferente nas duas sondas utilizadas, com maior número de cópias. Diferentes fatores podem ser responsáveis por este tipo resultados como: proximidade no local de inserção do transgene no genoma da planta, problemas de sensibilidade na metodologia de detecção utilizada, ou mesmo que esses transformantes foram originados de um único evento de transformação, mas multiplicados como linhagens diferentes.

Quando se utiliza o bombardeamento como método de transformação, como é o caso das plantas analisadas neste estudo, várias cópias do transgene

podem ser inseridas, inclusive no mesmo local do genoma. Todavia, as análises de Southern blot não permitiram visualizar esse padrão. De maneira interessante, o perfil de hibridização observado com as duas sondas foi diferente. O fato de o tempo de exposição para a revelação ter sido maior para a sonda *nptII* (duas horas a mais) pode ter permitido uma melhor visualização dos produtos de hibridização. É importante destacar que imediatamente após o processo de revelação outros produtos de hibridização, porém de menor intensidade foram observados na hibridização com a sonda *stx*. Estas bandas, contudo não foram visíveis após a foto-documentação. Conclui-se que a metodologia utilizada foi eficiente para a detecção do transgene, porém estudos adicionais visando determinar com maior precisão o número de cópias presentes em cada transformante são necessários.

Análises fenotípicas baseada em descritores morfológicos são de suma importância na caracterização de germoplasma (RAMOS e QUEIROZ, 1999). Embora existam características de *Musa* spp. que só se expressam na fase adulta (PILLAY et al, 2000) e que na maioria de estudos com espécies GM, níveis significativos de variabilidade morfológica não tenham sido relatados, análises comparativas quanto a descritores morfológicos entre plantas GM em relação às não transformadas foram realizadas.

Os dados obtidos na avaliação de parâmetros quantitativos não foram considerados representativos, pois apresentavam um alto coeficiente de variação. Esta variabilidade pode ter sido condicionada por diferenças existentes nas plantas no início da aclimatização, mas também pelo fato de algumas plantas foram aclimatizadas em épocas diferentes, devido à baixa taxa de multiplicação *in vitro* desta cultivar.

Embora cinco descritores qualitativos (tonalidade da cor verde do pseudocaule, antocianina externa do pseudocaule, forma da margem do pecíolo, cor da margem do pecíolo e cor da face ventral da nervura principal) evidenciaram polimorfismo, o mesmo foi considerado baixo. Adicionalmente, a separação dos genótipos em três grupos diferentes, com as plantas sem transformar (TM) alocadas em um grupo distinto da maioria dos transformantes, não foi considerada como indicativo de variações morfológicas contrastantes resultantes da inserção do transgene. Diversidade nos parâmetros avaliados inerente a essa cultivar, bem como a metodologia utilizada podem ser responsáveis pelos

agrupamentos identificados. Técnicas moleculares que possibilitam detectar polimorfismo em nível de DNA nesta espécie têm gerado um grande número de marcadores moleculares (PILLAY et al. 2000) que poderiam, no futuro, ser utilizado para a caracterização destas plantas.

Plantas GM têm sido geradas em diversas espécies no intuito de aumentar a resistência a patógenos. Entretanto, poucos estudos têm sido direcionados para determinar o impacto dessas plantas sobre a complexa comunidade microbiana do solo e associada à planta (KOWALCHUK et al., 2003; MOTAVALLI et al., 2004; LIU et al., 2005).

Valores significativamente menores de bactérias endofíticas foram observados nas plantas transformadas quando comparadas às não transformadas. Isto sugere que a expressão constitutiva da sarcotoxina IA está afetando diretamente o equilíbrio da flora bacteriana endofítica nessas plantas. Todavia, não foram observadas diferenças quando a população de fungos foi avaliada, indicando que a ação antimicrobiana é mais eficiente contra bactérias.

Embora em menor intensidade, efeitos significativos também foram encontrados sobre a comunidade bacteriana da rizosfera, confirmando mais uma vez o potencial da sarcotoxina IA sobre este grupo de microrganismos. Fatores como menor concentração do peptídeo no rizoplano, maior complexidade da comunidade microbiana na rizosfera, bem como menor estabilidade da proteína no substrato, podem ter contribuído para que o efeito detectado na rizosfera tenha sido menor quando comparado com o observado sobre a comunidade endofítica (LIU et al., 2005).

Decréscimos na população de bactérias na rizosfera de plantas transformadas com genes antimicrobianos foram também relatados em batata (AHRENHOLTZ et al., 2000). De maneira similar, Heuer et al. (1997) também observaram diminuição da população bacteriana em plantas transformadas com o peptídeo antimicrobiano Lisozima T4. Outros estudos, no entanto, não verificaram diferenças na população bacteriana entre plantas transgênicas e não transgênicas (SESSITSCH et al., 2002). Fatores relacionados à espécie de planta, tipo de substrato, tipos de construções e genes, bem como as técnicas empregadas para a detecção de microrganismos podem ter influenciado esses resultados (KOWALCHUK et al., 2003; DUNFIELD e GERMIDA, 2004; LIU et al., 2005).

Poucos estudos têm sido realizados avaliando o efeito de transgenes sobre a comunidade de microrganismos endofíticos. Em um dos poucos estudos encontrados na literatura, o impacto da expressão de genes antibacterianos sobre a população de bactérias endofíticas em batata foi comparável com os efeitos que podem provocar o tipo de genótipo, o tipo de solo ou mesmo a infecção por patógenos (RASCHE et al., 2006). Desta maneira, estudos adicionais visando verificar o efeito de outros fatores como os relatados nesse estudo são necessário no intuito de aprofundar os conhecimentos sobre dinâmica populacional de bactérias endofíticas nas plantas utilizadas neste trabalho.

A construção gênica empregada na geração das plantas utilizadas neste estudo tem o gene *stx* sob o controle do promotor 35S o qual garantiria uma alta expressão constitutiva. Adicionalmente, a construção possui um peptídeo sinal da proteína PR-1A que permite a translocação do produto gênico aos espaços extracelulares, local onde se encontram as bactérias. Assim, era de esperar um efeito significativo da sarcotoxina IA sobre bactérias presentes nessa região sejam patogênicas ou não. Entretanto, quando os transformantes foram inoculados com *R. solanacearum* não foi observada uma redução significativa da severidade da doença. As análises comparativas de índice da doença e AACPD revelaram variações, porém sem diferenças significativas. Entre as possíveis causas para explicar estes resultados estão o método de inoculação e a concentração inóculo utilizados, os níveis de expressão gênica ou mesmo o grupo bacteriano a qual pertence *R. solanacearum*.

Uma vez que o fenótipo de resistência esperado é quantitativo e condicionado pela ação direta da sarcotoxina IA sobre as bactérias, concentração de inóculo e a via com ela é administrada são fundamentais para visualizar o efeito do transgene. Assim, o método de inoculação utilizado, baseado na injeção no pseudocaule e a concentração de inóculo 1 mL (10^8 ufc.mL⁻¹) podem ser excessivamente agressivos para visualizar o efeito do transgene na redução da doença. É possível que a sarcotoxina IA esteja atuando, mas em níveis que não conseguem conter a infecção do patógeno, devido à que o número de células patogênicas é superior àquela que o a quantidade de peptídeo expresso consegue combater. Experimentos utilizando métodos de inoculação e concentrações de inóculo inferiores, de preferência que simulem o processo de infecção natural em campo, devem ser realizados, pois plantas em condições de

campo nunca se enfrentarão à pressão de inóculo utilizada neste estudo. Da mesma forma, estudos de expressão gênica em nível de transcrição são necessários no intuito de verificar o possível efeito dos níveis de expressão nos resultados obtidos, tanto nas análises microbiológicas quanto na inoculação com *R. solanacearum*.

A eficiência do gene *stx* na redução de doenças em plantas já foi constatada em citros contra *Xanthomonas anoxopodis* pv. *citri* (BESPALHOK FILHO et al., 2001). Adicionalmente, outros peptídeos antibacterianos como a *cecropin* MB39 e a *attacina* já foram utilizados com sucesso em outros patossistemas (AZEVEDO, 2005; NORELLI et al., 1994; KO et al., 2002). Todavia, outros estudos relataram o insucesso no aumento da resistência a doenças em plantas com este tipo peptídeos. Florack et al. (1995) transformaram fumo o gene da *cecropina* B, e não conseguiram aumentar a resistência contra *R. solanacearum* e *P. syringae* pv. *tabaci*. A rápida degradação da *cecropina* por proteases endógenas foi apontada como responsável pela baixa ação do peptídeo, pois os níveis de transcritos foram altos. De maneira similar, Hightower et al. (1994) não conseguiram aumentar a resistência de fumo a *P. syringae* pv. *tabaci* com a introdução de um gene quimérico de *cecropina* A/B.

Nota-se, que na maioria dos estudos estes peptídeos tiveram sucesso contra bactérias dos gêneros *Xanthomonas*, *Erwinia*, e em algumas espécies de *Pseudomonas*. Nos bibliografia consultada, resultados positivos com *R. solanacearum* não foram encontrados. Desta forma, o tipo de bactéria ou grupo bacteriano poderia influenciar na eficiência destes peptídeos, pelo que estudos direcionados a responder esta hipótese são necessários.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho plantas de bananeira cultivar Terra Maranhão transformadas com o gene *stx*, que codifica para a sarcotoxina IA foram caracterizadas fenotípica e molecularmente.

Foi confirmado que as plantas transformadas possuem o inserto tanto do gene *stx* quanto do gene marcador *nptII*, porém estudos direcionados a determinar o número exato de cópias precisam ser conduzidos.

A caracterização morfológica revelou variações entre genótipos, porém não foram consideradas como contrastantes para esta cultivar nas condições experimentais utilizadas. Já as análises microbiológicas revelaram níveis significativamente menores de bactérias endofíticas e rizosféricas nas plantas transformadas do que nas não transformadas. Nas mesmas condições experimentais, não foi observado qualquer efeito sobre população de fungos, o que indica um maior efeito antimicrobiano ou seletividade da construção utilizada sobre bactérias.

A diversidade microbiana não foi avaliada, porém estes estudos são de vital importância e deverão ser realizados no intuito de verificar quais são os grupos microbianos mais frequentes em plantas transformadas ou não. Técnicas moleculares que permitem a detecção de diversidade e identificação de microrganismos em larga escala deverão ser utilizadas.

Não foi verificada redução significativa da doença quando as plantas foram inoculadas com *R. solanacearum*. Embora sem diferenças significativas, as análises comparativas de índice da doença e AACPD, bem como a taxa de progresso da doença revelaram variações com alguns eventos mostrando valores ligeiramente menores de intensidade da doença. Nesse sentido, é importante ressaltar que a diferença de genes importantes na transdução de sinais, onde podem ser esperados efeitos qualitativos mediados por reação de hipersensibilidade (HR- Hypersensitive Response), o fenótipo de resistência esperado para este tipo de gene é quantitativo. Assim, fatores como concentração de inóculo e método de inoculação são fundamentais para visualizar o efeito do transgene. Experimentos utilizando métodos de inoculação e concentrações de inóculo inferiores às utilizadas neste estudo, de preferência que simulem o processo de infecção natural em campo, devem ser realizados no intuito de

caracterizar melhor o fenótipo de resistência ao Moko. Um problema que precisa ser atendido é a recalcitrância à micropropagação que apresenta a cultivar Terra Maranhão, pois estudos com um maior número de plantas precisam ser conduzidos para garantir a representatividade dos resultados.

Os resultados obtidos no presente estudo, apesar de preliminares, representam o primeiro relato de caracterização de banana transgênica no Brasil e constituem um importante passo para o entendimento dos efeitos que peptídeos antimicrobianos podem induzir sobre os microrganismos sejam alvos ou não. Adicionalmente, abrem novas interrogantes ao uso de plantas transgênicas expressando constitutivamente peptídeos antimicrobianos de amplo espectro na agricultura. Se efetivamente estes peptídeos reduzem a população de bactérias endofíticas e rizosféricas, a utilização de uma cultura GM com estes genes poderiam trazer sérias conseqüências tanto para a cultura alvo quanto no ambiente. Estudos visando verificar se a diminuição da população de bactérias endofíticas ou na rizosfera implicará em aumento da susceptibilidade a outras doenças a exemplo do mal-do-Panamá deverão ser conduzidos. Da mesma forma caso o potencial de uso destes peptídeos se concretize outras estratégias de engenharia genética, como a obtenção de peptídeos sintéticos e uso de promotores induzidos pelo patógeno deverão ser empregadas.

Finalmente, é importante ressaltar que estudos visando a obtenção de bananeira transgênica com o gene *stx*, foram realizados pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical em título de prova de conceito, pois a própria origem do gene (mosca varejeira) e a conotação social da cultura da bananeira dificultaria enormemente a aceitação de plantas GM sob estas condições.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
- AHRENHOLTZ, I.; HARMS, K.; DE VRIES, J.; WACKERNAGEL, W. Increased killing of *Bacillus subtilis* on the hair roots of transgenic T4 lysozyme-producing potatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1862-1865, 2000.
- AKIEW, E., TREVORROW, P. R. Management of Bacterial Wilt of Tobacco. In: **Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, p.179-198, 1994.
- ALDERBORN, A.; SUNDSTROM, J.; SOERIA-ATMADJA, D.; SANDBERG, M.; ANDERSSON, H.C.; HAMMERLING, U. Genetically modified plants for non-food or non-feed purposes: Straightforward screening for their appearance in food and feed. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.453-464, 2010.
- ALIPPI, A. M.; DAL BO, E.; RONCO, L. B; LÓPEZ, M. V.; LÓPEZ, A. C.; AGUILAR, O. M. *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. **Plant Pathology**, v.52, p.287-302, 2003.
- ALLEN, C.; SIMON, L.; ATKINSON,; SEQUEIRA, L. Analysis of polygalacturonase as a competent of bacterial wilt disease. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, Kaoshiung, 1992. **Proceedings**. Kaoshiung: ACIAR, 1992. p. 283-284.
- ALVES, E. J. **Cultivo da bananeira tipo Terra**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura EMBRAPA/CNPMPF, 2001.176p.
- ALY, R., D. GRANOT, Y. MAHLER-SLASKY, N. HALPERN, D. NIR e E. GALUN. *Saccharomyces cerevisiae* cells harboring the gene encoding sarcotoxin IA secrete a peptide that is toxic to plant pathogenic bacteria. **Protein Expression and Purification**, v.16, n.1, p.120-124, 1999.
- ANDERSEN, P. C.; ISHIDA, M. L.; MOMOL, E. A.; BRODBECK, B. V.; LEITE, B.; MOMOL, M. T. Influence of *Vitis* xylem fluid plus cecropin on growth of *Xylella fastidiosa*. **Vitis**, Berlin, v.43, n.1, p. 19-35, 2004.
- ASSIS, S. M. P.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas- método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 216-220, 1998.
- AZEVEDO, F. A. Transformação geética de citros com genes de bacteriopsina (*bO*), cecropina e gus. **Tese de doutorado em fitotecnia**. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 76p., 2005.
- BECHINGER, B. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. **Journal of Membrane Biology**, v.156, p.197-211, 1997.

BESPALHOK FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Laranja transgênica: transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 28, p. 229-234, 2001.

BOMAN, H.G.; HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.103-126, 1987.

BOMAN, H. G.; STEINER, H. Humoral immunity in *Cecropia pupae*. **Current Topics in Microbiological Immunology**, v.94-95, p.75-91, 1981.

BORBOREMA, M. D. Comercialização e mercado bananeiro atual e perspectivas. Palestra. Simpósio Brasileiro sobre Bananicultura e Workshop do Genoma Musa, Paracatu, 2003. In: MATOS, A.P.; MEISSNER FILHO, P.E. (Ed.). Cruz das Almas: **Nova Civilização**, 2003. 270 p. Palestra 48-56.

BOSCARIOL, R. L. Transformação genética de laranja doce com os genes manA, atacina A e Xa21. **Tese de doutorado em Energia Nuclear na Agricultura**. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 87 p, 2004.

BOSHOU, I. A broad review and perspective on breeding for resistance to bacterial wilt. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* specieux complex**. St. Paul: APS, p. 225-238, 2005.

BOUCHER, C. A.; GENIN, S. The *Ralstonia solanacearum*-plant interaction. In: TALBOT, N. J. Ed. **Annual Plant Reviews: Plant pathogen interactions**, v. 11, cap. 4, 2004.

BOUCHER, C. A.; VAN GIJSEGEM, F.; BARBERIS, P. A.; ARLAT, M.; ZISCHEK, C. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 5626-5632, 1987.

BOUCHER, C. A.; VAN GIJSEGEM, F.; BARBERIS, P. A.; ARLAT, M.; ZISCHEK, C. *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. **Journal General Microbiology**, v. 131, p. 2449-2457, 1985.

BRINGEL, J. M. M. Caracterização bioquímica, patogênica e molecular de isolados de *Ralstonia solanacearum* biovar 2, de batata e berinjela. **Tese de doutorado**, Piracicaba – SP, 2002.

BUDDENHAGEN, I. W.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v.52, p.726, 1962.

BULLET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J-L; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental & Comparative Immunology**, v.23, p.329-344,1999.

CARDOSO, S. C., BARBOSA-MENDES, J. M., BOSCARIOL-CAMARGO, R. L., CHRISTIANO, R.S.C., BERGAMIN, A., VIEIRA, M.L.C., MENDES, B.M.J.; MOURAO, F.D.A, Transgenic Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Expressing the attacin A Gene for Resistance to *Xanthomonas citri* subsp *citri*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 28, p.185-192, 2010.

Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola, 2009 - Epagri/Cepa. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br/apresenta.htm>>. Acesso em: 5 de julho de 2010.

CLARK, F. E. Agarplate method for total microbiol count. *In*: BLACK, C. A.; EVANS, D. D.; ENSMINGER, L. E.; WHITE, J. L.; CLARK, F. E. **Methods of soil abalysis**. Madison: American Society of Agronomy, v. 2, p. 1460-1466, 1965.

COOK, D.; SEQUEIRA, L. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. *In*: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. **Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, p. 77-93, 1994.

COPLIN, D.L.; COOK, D. Molecular Genetics of Extracellular Polysaccharide Biosynthesis in Vascular Phytopathogenic Bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, n. 5, p. 271-279, 1990.

CORDEIRO, Z. J. M. (Org). **Banana produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 143 p.

CRUZ, C. D. **Programa genes** (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2008.

DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. S. Classificação botânica, origem e evolução. *In*: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.) **Banana**. Produção: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p.12-16.

DAUGHTREY, M. Southern bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*. **Society of American Florists** 19th Annual Conference on Insect and Diseases Management on Ornamentals, 2003.

D'HONT, A.; PAGET-GOY, A.; ESCOUTE, J. ; CARREEL, F. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa spp*. Revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 2, p. 177-183, 2000.

DE PAOLI, L. G.; CAMARGO, R. L. B.; HAKAKAVA, R.; MENDES, B. M. J.; MOURAO FILHO, F. A. A. Genetic transformation of 'Valencia' sweet orange with the cecropin MB39 gene. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.11, p.1663-1666, 2007.

DENNY, T. P.; BAEK, S. R. Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor os *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 4, p. 198-206, 1991.

DENNY, T. P.; BRUMBLEY, S. M.; CARNEY, B. F.; CLOUGH, S. J.; SCHELL, M. A. Phenotype conversion of *Pseudomonas solanacearum*. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, Kaoshiung, 1994. **Proceedings**. Kaoshiung: ACIAR, 1994. p. 252-256.

DENNY, T. P. *Ralstonia solanacearum* – a plant pathogen in touch with its hosts. **Trends in Microbiology**, v.11, p. 486-489, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, v.19, p.11-15, 1987.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Impact of genetically modified crops on soil – and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p.806-815, 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Acesso em: 01 de agosto de 2010.

FEGAN, M.; PRIOR, P. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilt of banana. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, p. 93-101, 2006.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex?” In: ALLEN C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (Eds.), **Bacterial wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**, APS Press, p. 449-461, 2005.

FERREIRA, L. P.; SALGADO, C. L. Bactérias. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, v.1, Princípios e conceitos, p. 97 -130, 1995.

FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial da banana: produção, comércio e participação brasileira. **Informações Econômicas**, SP, v.33, n.10, 2003.

FLORACK, D.; ALLEFS, S.; BOLLEN, R.; BOSCH, D.; VISSER, B.; STIEKEMA, W. Expression of giant silkmouth cecropin B genes in tobacco. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 4, n. 2, p. 132-141, 1995.

FREIRE, F. DAS C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. Doenças de frutíferas tropicais de interesse agroindustrial; Brasília, DF; **Embrapa Informação Tecnológica**, 2003. 687p.

GENIN, S.; BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum* : secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, p. 111-118, 2002.

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v.42, p.611-643, 1997.

HARAKAVA, R. **Citrus variegated chlorosis: development of transgenic resistance and molecular studies of pathogenesis.** Thesis (Ph.D.) University of Florida, Gainesville, 70p, 2000.

HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v.29, p.65-87, 1991.

HAYWARD, A. C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.27, p.265-277, 1964.

HAYWARD, A. C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Eds.) **Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*.** Wallingford: CAB International, p.123-135, 1994.

HE, L.Y.; SEQUEIRA, L; KELMAN, A. Characteristics of starin af *Pseudomonas solanacearum* from China. **Plant disease**, v.67, p.1357-1361, 1983.

HETRU, C.; HOFFMANN, D.; BULLET, P. Antimicrobial peptides from insects. en Hultmark. PTBaD (Ed). **Molecular mechanisms of immune responses in insects.** Chapman & Hall. London, p.40-66, 1998.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, R. M.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1325–1335, 2002.

HEUER, H., KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K., WELLINGTON, E. M. H., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in the denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3233-3241, 1997.

HIGHTOWER, R.; BADEN, C.; PENZES, E.; DUNSMUIR, P. The expression of cecropin peptide in transgenic tobacco does not confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. **Plant Cell Reports**, v. 13, p-295-299, 1994.

HUANG, J.; DENNY, T. P.; SCHELL, M. A. VrsB a regulador of virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*, is homologous to sensors of the two-component regulator family. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p.6169-6179, 1993.

IBGE. Instituto Brasileiro de Gerografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em: 31 de julho de 2010.

ISHIDA, M. L.; ANDERSEN, P. C.; LEITE, B. Effects of *vitis vinifera* L. cv. Chardonnay xylem fluid on cecropin B activit against *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.64, p.73-81, 2004.

JANSE, J. D. **Phytopathology principles and practice.** Wageningen: C.A.B. International, 2005. 366p.

JAYNES, J. M.; NAGPALA, P.; DESTEFANO-BELTRAN, L.; HONG-HUNG, J.; KIM, J.; DENNY, T.; CETINER, D. Expression of a cecropin B lytic peptide analogue in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Science**, v.8, p.43-53, 1993.

JIA, S.R.; QU, X. M.; FENG, L. X.; TANG, T.; TANG, Y. X.; LIU, K.; ZHENG, P.; ZHAO, Y.L.; BAI, Y. Y.; CAI, M.Y. Development of potato clones with enhanced resistance to bacterial wilt by introducing antibacterial peptide gene. **Scientia Agricultura Sinica**, v.31, p.13-18, 1998.

KELMAN, A.; HARTMAN, G. L.; HAYWARD, D. C. Introduction. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G.L. (Ed). **Bacterial wilt: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Willingford: CAB International, 1994, p. 1-7.

KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: a literature review and bibliography. **Agriculture of Experimental Station**, v.2, p.194, 1953.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, v. 44, p. 693-695, 1954.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. vol. 2, 4 ed. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 2005. 663 p.

KO, K. S., NORELLI, J. L., REYNOIRD, J. P., ALDWINCKLE, H. S.; BROWN, S. K. T4 lysozyme and attacin genes enhance resistance of transgenic 'Galaxy' apple against *Erwinia amylovora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.127, p.515-519, 2002.

KOWALCHUK, G.A.; BRUINSMA, M; VAN VEEN, J.A. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.18, p.403-410, 2003.

LIMA, M. B.; SILVA, S. O.; FERREIRA, C. F. **Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, 182 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

LIU, B.; ZENG, Q.; YAN, F.; XU, H.; XU, C. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 27, p.1-13, 2005.

MANICA, Ivo. **Fruticultura tropical: 4. banana**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. 485 p.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, Birmingham, v.27, n. 2, p.209-220, 1967.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P.; MELLO, M. R. F.; MOURA, F. F.; ANDRADE, A. Q. V. SILVA, G. Método de isolamento de bactérias endofíticas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 235, 1997.

McKINNEY, R. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v.6, p. 195 – 218, 1923.

MEHAN, V. K.; LIAO, B. S.; TAN, Y. J.; ROBINSON-SMITH, A.; McDONALD, D.; HAYWARD, A. C. **Bacterial wilt of Groundnut**. Patancheru: Internacional Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1994, 28p. (Information Bulletin, 35).

MENG, S.; XU, H.L.; WANG, F.S. Research Advances of Antimicrobial Peptides and Applications in Food Industry and Agriculture. **Current Protein & Peptide Science**, v.11, p.264-273, 2010.

MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. ISBN 85-87459-06-6, 368 p.

MIRANDA, E. F. O.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Colonização de raízes de plantas daninhas cultivadas *in vitro* e em vasos por *Ralstonia solanacearum*, biovars 1, 2 e 3. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, n.2, p. 121-127, 2004

MITSUHARA, I., H. MATSUFURU, M. OHSHIMA, H. KAKU, Y. NAKAJIMA, N. MURAI, S. NATORI e Y. OHASHI. Induced expression of sarcotoxin IA enhanced host resistance against both bacterial and fungal pathogens in transgenic tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, n.8, p.860-868, 2000.

MONTANELLI, C.; NASCARI, G. Introduction of an antibacterial gene in popato (*Solanum tuberosum* L.) using a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal of Genetic and Breeding**, Florence, v. 45, p. 307-316, 1991.

MONTESINOS, E., Antimicrobial peptides and plant disease control. **Fems Microbiology Letters**, v. 270, p.1-11, 2007.

MOREIRA, R. S. **Banana: Teoria e Prática de Cultivo**. Campinas. Fundação Cargil, 1987. 335p.

MOREIRA, R. S. **Banana: teoria e prática de cultivo**. São Paulo: Fundação Cargill, 1999. CD-ROM.

MOTAVALLI, P. P.; KREMER, R. J.; FANG, M.; MEANS, N. E. Impact of geneticallly modifies crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations. **Journal of Enviromental Quality**, Madison, v. 38, p. 816-824, 2004.

MOURA, R. J. M.; SILVA JÚNIOR, J. F.; SANTOS, V.F.; GOUVEIA, J. Espaçamento para o cultivo da bananeira “Comprida verdadeira (Musa AAB) na Zona da Mata Sul de Pernambuco (1º ciclo). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 697-699, 2002.

NORDEEN, R. O.; SINDEN, S. L.; JAYNES, J. M.; OWENS, L. D. Activity of cecropin SB37 against protoplasts from several plant-species and their bacterial pathogens. **Plant Science**, v. 82, p.101-107, 1992.

NORELLI, J. L.; ALDWINCKLE, H. S.; DESTEFANO-BELTRAN, L.; JAYNES, J. M. Transgenic Malling 26' apple expressing the *attacin* E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. **Euphytica**, v.77, p.123-128, 1994.

OEPP/EPPO (2006). Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe. *Ralstonia solanacearum* race 2. Disponível em: <<http://pqr.eppo.org/datas/PSDMS2/PSDMS2.pdf>>. Acesso em: 20 de agosto de 2010.

OHSHIMA, M., I. MITSUHARA, M. OKAMOTO, S. SAWANO, K. NISHIYAMA, H. KAKU, S. NATORI e Y. OHASHI. Enhanced resistance to bacterial diseases of transgenic tobacco plants overexpressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. **Journal of Biochemistry**, v.125, n.3, p.431-435, 1999.

PALLERONI, N. J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v.23, p.333-339, 1973.

PELCZAR JR, MICHAEL J; CHAN, E.C. S; KRIEG, NOEL R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. V. 2. 2 ed. São Paulo: MAKRON Books, 1996. 517p.

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A. F. S.; VÈRAS, S. M. **Doenças da bananeira no Estado do Amazonas**. Manaus: Embrapa-CPAA, 2000. 27p. (Embrapa-CPAA. Circular Técnica, 7).

PILLAY, M.; NWAKANMA, D. C.; TENKOUANO, A. Identification of RAPD markers linked to A and B genome sequences in *Musa* L. **Genome**, v.43, p.763-767, 2000.

PINHEIRO, R. C. Caracterização molecular e diversidade genética de *Ralstonia solanacearum*, agente causal do Moko da bananeira. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Vegetal**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 81p., 2010.

PRIOR, P.; FEGAN, M. Recent Developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. **Acta Horticulturae**, v. 695, p. 127-136, 2005.

RAMOS, S. R. R.; QUEIROZ, M. A. Caracterização morfológica: experiência do BAG de cucurbitáceas da Embrapa Semi – Árido, com acessos de abóbora e moranga. **Horticultura Brasileira**, v. 17, p. 9 – 12, 1999.

RASCHE, F., HODI, V., POLL, C., KANDELER, E., GERZABEK, M. H., VAN ELSAS, J. D., SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology** v. 56, p.219–235, 2006.

RATCLIFFE, N. A. Invertebrate immunity - a primer for the non-specialist. **Immunology Letters**, v.10, p.253-270, 1985.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, p. 536-547, 2004.

ROCHELLE, L. A.; RODRIGUES, R. R.; CAPELLARI JUNIOR, L. **Família de plantas fanerogâmicas de interesse econômico**. Piracicaba: CALQ, 1991. 57p.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa, Editora UFV, 2001. 297p.

SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLA, M.; BILLAULT, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J. C.; CATTOLICO, L.; CHANDLER, M.; CHOISNE, N.; CLAUDEL-RENARD, C.; CUNNAC, S.; DEMANGE, N.; GASPIN, C.; LAVIE, M.; MOISAN, A.; ROBERT, C.; SAURIN, W.; SCHIEX, T.; SIGUIER, P.; THÉBAULT, P.; WHALEN, M.; WINCKER, P.; LEVY, M.; WEISSENBAACH, J.; BOUCHER, C. A. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, v.415, p. 497-502, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T; Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, 2nd Ed., 1989.

SCHAAD, N. W.; JONES J. B. & CHUN W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3 ed., 2001. 373p.

SCHELL, M. A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p.263-292, 2000.

SCHELL, M.A. Purification and characterization of an endoglucanase from *Pseudomonas solanacearum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2237-2241, 1987.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SESSITSCH, A.; KAN, F.Y.; PFEIFER, U. Diversity and community structure of culturable. Diversity and community structure of culturable *Bacillus* spp. populations in the rhizospheres of transgenic potatoes expressing the lytic peptide cecropin B. **Applied Soil Ecology**, v. 22,n. 2, p.149-158, 2003.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization in the expression of Slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**. v.67, p.1051-1056. 1977.

SILVA, S. de O.; CARVALHO, P. C. L. de; SHEPHERD, K.; ALVES, E. J.; OLIVEIRA, C. A. P.; CARVALHO, J.A.B.S. **Catálogo de germoplasma de bananeira (*Musa spp.*)**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMP, 1999. 152p. (Documentos, 90).

SILVA, S. de O.; PEREIRA, J. C. R.; LIMA NETO, F. P.; KOBAYASHI, A. K. Plant breeding for resistance to bacterial wilt in musaceae. In: **XVI Reunião Internacional ACORBAT** . Publicación Especial, p. 36-43. 2004.

SILVA, S. de O.; SHEPHERD, K.; ALVES, E. J.; DANTAS, J. L. L. Cultivares de banana. In: ALVES, E.J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 85-105, 1999.

SILVEIRA, J. R. P.; DUARTE, V.; MORAES, M. G. Ocorrência de biovars 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum* em lavouras de batata no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p. 450-453, 2002.

SIMÃO, S. **Manual de Fruticultura**. Piracicaba: ESALQ, Banana, p. 230-258. 1971.

SMITH, M.K., WHILEY, A.W., SEARLE, C., LANDON, P.W., SCHAFFER, B. AND PEGG, K.G. Micropropagated banana are more susceptible to Fusarium wilt than plants grown from conventional material. **Australian Journal of Agricultural Research**. 49, p. 1133-1139, 1998.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origin of the cultivated bananas. **The Botany Journal of Linnean Society of London**, v. 55, n. 359, p. 302-312, 1955.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOEJIMA, J., ABE, K., KOTODA, N. A.; KATO, H. Recent progress of apple breeding at the apple research center in Morioka. **Acta Horticulturae**. (ISHS) n. 538, p.211-214, 2000.

SOFFNER, M. L. A. P. Produção de polpa celulósica a partir do engaço da bananeira. **Dissertação de mestrado**. Piracicaba, SP, 2001.

SOKAL, R. R. and ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p.33-40, 1962.

SOTO BALLESTERO, M. **Bananos: cultivo y comercialización**. 2.ed. San José, Costa Rica: Litografía e Imprenta Lil, 1992. 674 p.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v.98, p. 503-517, 1975.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (data analysis software system), version 7.1. Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA), 2005.

STEVENS, P.; VAN ELSAS, J.D. Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 strains obtained from Dutch waterways. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 2, p. 171-188, 2010.

TUNG, P. X.; RASCO, E. T.; ZAAG, P. V.; SCHMIEDICHE, P. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato: I. Effects of sources of resistance and adaptation. **Euphytica**, v. 45, p. 203-210, 1990.

VAN GIJSEGEN, F.; GENIN, S.; BOUCHER, C. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 1, p.175-180, 1993.

VASSE, J.; FREY, P.; TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 8, p. 241-251, 1995.

VON PARSEVAL, M. Uma doença do fumo e batata inglesa no município de Santa Cruz, R.S., causada pelo *Bacterium solanacearum*. **Boletim do Instituto Borges de Medeiros**. Porto Alegre, v.1, p.13, 1922.

YABUUCHI, E; KOSAKO, Y; OYAIZU, H; YANO, I; HOTTA, H; HASHIMOTO, Y; EZAKI, T; ARAKAWA, M. Proposal of Burkholderia gen. Nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. **Microbiology and Immunology**, v.36, p.1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. Nov.: proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) comb. Nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) comb. Nov. and Ralstonia eutropha (Davis 1969) comb. Nov. **Microbiology and Immunology**, v. 39, p.897-904, 1995.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas fruteiras**, v. 2. Viçosa, 2002, 1309 p.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v.415, p.389-395, 2002.